

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA

**DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE ADAM33 É UM MARCADOR PREDITIVO DE
CÂNCER DE MAMA AGRESSIVO**

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA

**DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE ADAM33 É UM MARCADOR PREDITIVO DE
CÂNCER DE MAMA AGRESSIVO**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná. Área de concentração: Patologia

Linha de pesquisa: Epigenética e Câncer de Mama

Orientadora: Dra Giseli Klassen

Co-orientadores: Dr Emanuel M. de Souza

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Manica, Graciele Cristiane More

Diminuição da expressão de ADAM33 é um marcador preditivo de câncer de mama agressivo. / Graciele Cristiane More Manica. – Curitiba, 2016.

88 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Giseli Klassen

Coorientadores: Emanuel M. de Souza

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Mamas - Cancer 2 Marcadores biológicos de tumor I. Título II. Klassen, Giseli III. Souza, Emanuel Maltempi de IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.99249



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

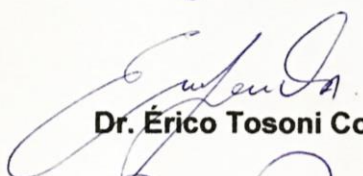
“Diminuição da expressão da proteína ADAM33 e sua relação com mau prognóstico no câncer de mama”

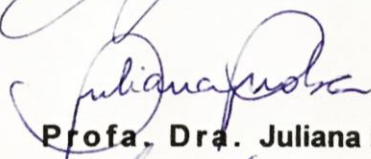
por

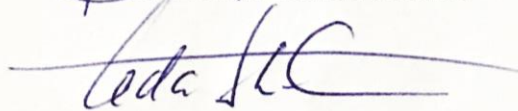
Graciele Cristiane More Manica

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Profa. Dra. Giseli Klassen - Presidente


Dr. Érico Tosoni Costa


Profa. Dra. Juliana Inaba


Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu


Profa. Dra. Edneia A. S. R. Cavaliere

Curitiba, 14 de outubro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, quero agradecer a minha orientadora, *Giselli Klassen*, ela que um dia atendeu o telefone, e aceitou me conhecer. E depois, me deu a chance de conhecer esse “mundo” dentro da universidade, me ensinou como ser uma professora, uma pesquisadora, uma pessoa que corre atrás dos seus ideais. Como também, sempre tinha uma palavra confortante nos momentos em que as coisas não iam bem! Muito obrigada!

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela atenção oferecida ao trabalho.

Aos vários colegas de laboratório: no Laboratório de Imunologia, LabNefro, Laboratório de Neurobiologia. Onde, sempre tive apoio, com trocas de experiências e ajuda no desenvolvimento de técnicas.

Aos alunos do departamento de Bioquímica, todos que estavam ou passaram pelas salas 275 e 272.

A Carol Fidalgo Ribeiro, que fez parte desse trabalho, mas também, pelos anos de convívio.

Ao Valter Baura pelas reações de sequenciamento, e pela ajuda no que se fosse necessário. A D. Roseli pelos inúmeros auxílios durante todos estes anos.

Ao Laboratório De Patologia Experimental Da Pontifícia Universidade Católica Do Paraná pela da Ana Paula Camargo e Marina Luise Viola De Azevedo na confecção dos TMAs e nas colorações imunoistoquímicas. À Dra. Lucia de Noronha, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À Dra Ana Paula Martins Sebastião, pela leitura dos TMAs e por toda a ajuda que sempre dispôs.

Às minhas amigas: Edneia, Isabela, Andressa, Liliane, Mariana e Yara. Por todo o tempo de convivência, pelas palavras de amizade e carinho!

Em uma lista não caberá todas as pessoas que gostaria de agradecer, foram seis anos vividos com pessoas especiais, algumas que passaram, outras que vão continuar em minha vida!

Ao programa de Pós-graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia e a CAPES pela oportunidade e pela disponibilidade da bolsa.

À minha família, minha mãe, pai, irmão, e sogra, que sempre me deram força e carinho.

Ao meu marido, André, em especial, pelos momentos de felicidade. Seu apoio incondicional, paciência, atenção e dedicação.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. É uma doença heterogênea, com diferenças em suas características clínicas, moleculares e biológicas. Tradicionalmente, os marcadores de imunohistoquímica em conjunto com os parâmetros clínico-patológicos são usados para classificar esse tipo de câncer e prever a evolução da doença. Dentre os subtipos moleculares de câncer de mama, os carcinomas triplo negativo (TNG) são definidos pela ausência de expressão de receptores hormonais e do gene *HER2*. Cerca de 80% dos TNG apresentam o fenótipo basal, por expressar proteínas que caracterizam células mesenquimais e são denominados como o subtipo basalóide (BLBC) de câncer de mama. Os TNG são os subtipos mais agressivos de câncer de mama, com pior prognóstico, e ausência de terapia específica. Estudos anteriores do grupo de pesquisa, evidenciaram que o gene *ADAM33*, pode ser silenciado por hipermetilação do DNA no câncer de mama. Diversas proteínas da família ADAM já foram relacionadas ao desenvolvimento e progressão de tumores. Diante dessas observações, a expressão diferencial do gene *ADAM33* motivou ao nosso grupo de pesquisa investigar se a proteína ADAM33 poderia ser utilizada como um biomarcador no câncer de mama. No presente estudo, foram produzidos anticorpos monoclonais contra a proteína ADAM33 para que esse pudesse ser utilizado em ensaios de imunohistoquímica em amostras parafinadas de câncer de mama. Para isso, após a obtenção de um hibridoma secretor e ensaios de caracterização de anticorpo monoclonal, esse foi utilizado, juntamente com um painel de marcadores moleculares (RE, PR, HER2, EGFR, CK 5/6, CK14, CK17, c-Kit e Ki-67) em 212 amostras de tumores de mama. E pode-se comparar os escores da proteína ADAM33 com os dados clínico-patológicos das pacientes, para determinar sua importância como um marcador de prognóstico ou preditivo para o câncer de mama. A baixa expressão da proteína ADAM33 foi relacionada com TNG e BLBC, e com uma menor sobrevida global e sobrevida livre de metástases. O achado mais importante deste trabalho é que a baixa expressão de ADAM33 no câncer de mama tem um valor prognóstico independente. A diminuição da expressão dessa proteína está associada ao risco de desenvolvimento de metástases e morte. Assim, a avaliação de ADAM33 por IHQ poderia ser utilizado como um marcador de prognóstico para os subtipos TNG e BLBC.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer in women around the world. It is a heterogeneous disease with differences in its clinical, molecular and biological features. Traditionally, immunohistochemical markers together with clinicopathologic parameters are used to classify breast cancer and to predict disease outcome. Triple-negative breast cancer (TNBC) is a particular type of breast cancer that is defined by a lack of expression of hormonal receptors and *HER2* gene. About 80% of TNBC also have a basal-like phenotype (BLBC) with expression of cytokeratin 5/6 and/or EGFR, characterized by protein expression of mesenchymal cells. TNG are the most aggressive subtypes of breast cancer with worse prognosis and lack of specific therapy. In that regard, the *ADAM33* gene is silenced by DNA hypermethylation in breast cancer, which suggests that ADAM33 might be useful as a molecular marker. In the present study, we have produced monoclonal antibodies against the ADAM33 protein and have investigated role of ADAM33 protein in 212 breast tumor samples breast cancer. We compare clinicopathological information and the expression of a panel of IHC markers (ER, PR, HER2, EGFR, CK 5/6, CK14, CK17, c-Kit and Ki67) with the ADAM33 protein scores to determine whether ADAM33 protein is clinically efficient as a prognostic or predictive marker for breast cancer. We compare the ADAM33 protein scores with clinicopathological data from 212 patients to determine their importance as a predictor and prognostic marker for breast cancer. The low expression of ADAM33 protein was related to TNBC and BLBC, and with a lower overall survival and metastasis-free survival. The most important finding of this study is that low ADAM33 expression in breast cancer has an independent prognostic value. Decreasing the expression of this protein is associated with risk of development of metastases and death. Thus, the evaluation of ADAM33 protein by IHC could be used as a prognostic marker for TNBC and BLBC subtypes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- ESTIMATIVA BRASILEIRA DE NOVOS CASOS DE CÂNCER EM MULHERES PARA O ANO DE 2016.....	11
FIGURA 2	- MODELO HISTOLÓGICO DO DESENVOLVIMENTO E EVOLUÇÃO DO CÂNCER DE MAMA.....	15
FIGURA 3	- ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS ADAMs.....	21
FIGURA 4	- VARREDURA DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS ANTI-ADAM33 POR ELISA.....	41
FIGURA 5	- EXPRESSÃO DE ADAM33 EM LINHAGEM NORMAL DE MAMA.....	42
FIGURA 6	- EXPRESSÃO DE ADAM33 EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	43
FIGURA 7	- AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA A CADEIA PESADA DA IgG DO HIBRIDOMA.....	45
FIGURA 8	- AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA A CADEIA LEVE (V _k) DA IgG DO HIBRIDOMA...	45
FIGURA 9	- COLAR DE PÉROLAS DAS SEQUÊNCIAS DOS DOMÍNIOS VARIÁVEIS DO GMGK06.....	46
FIGURA 10	- REATIVIDADE DO ANTICORPO PURIFICADO POR ELISA E WB.....	47
FIGURA 11	- EXPRESSÃO DE ADAM33 EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA PARAFINADO.....	51
FIGURA 12	- CORRELAÇÃO ENTRE OS ESCORES DE ADAM33 E OS MARCADORES MOLECULARES.....	55
FIGURA 13	- CURVA DE KAPLAN-MEIER PARA O TEMPO DE PROGRESSÃO DE ACORDO COM O ESCORE DE ADAM33.....	56

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	- OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA AS REAÇÕES DE PCR E SEQUENCIAMENTO DO HIBRIDOMA SECRETOR DE IgG.....	35
QUADRO 2	- DETERMINAÇÃO DO ESCORE DE ADAM33 NOS TUMORES DE MAMA POR IHQ.....	38
QUADRO 3	- CARACTERÍSTICAS DAS LINHAGENS CELULARES.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- DADOS CLÍNICOS PATOLÓGICOS EM RELAÇÃO AO ESCORE DA ADAM33.....	51
TABELA 2	- O TEMPO DE PROGRESSÃO DO CANCER DE MAMA EM RELAÇÃO ÀS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS: REGRESSAO DE COX MODELO DE RISCOS PROPORCIONAIS.....	57

LISTA DE SIGLAS

BLBC – Basalóide/*Basal-like*
CDI - Carcinoma Ductal Invasor
CDIS - Carcinoma Ductal *In Situ*
CDR - *Loops* Hipervariáveis
Ck – Citoqueratina
CLI - Carcinoma Lobular Invasor
CLIS - Carcinoma Lobular *In Situ*
EGF - Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
FR - Regiões de Estrutura
HAT - Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
HDA - Hiperplasia Ductal Atípica
HER2- Receptor do Fator de Crescimento Epidermal 2
HLA - Hiperplasia Lobular Atípica
HR - Risco Relativo
HT - Hipoxantina e Timidina
HTU - Hiperplasia do Tipo Usual
Icq - Imunocitoquímica
IGFR - Receptor de Fator de Crescimento Insulina-Símile
Ihq - Imunohistoquímica
IMGT - Sistema Internacional de Informação Imunogenética
INCA - Instituto Nacional do Câncer
INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial
Lum A – Luminal A
Lum B – Luminal B
Mab – Anticorpo Monoclonal
MFS - Sobrevida Livre de Metástases
MSP - Methylation Specific PCR
OS - Sobrevida Global
PARP - Poli ADP Ribose Polimerase
RE- Receptor de Estrogênio
RP - Receptor de Progesterona
SBR - Classificação Scarff-Bloom-Richardson
SNP - Polimorfismos de Nucleotídeo Único
TDLU – Unidade Terminal Ducto Lobular
TGF β - Fator de Crescimento Transformante β
TMA - *Tissue Micro Array*
TNG - Carcinomas Triplo-Negativo
Vh - Cadeia Pesada
VI - Cadeia Leve
WB - Western Blot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O CÂNCER DE MAMA	11
1.2 MARCADORES PROGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS	13
1.3 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA	14
1.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA	17
1.5 FAMÍLIA DE PROTEÍNAS ADAM	20
1.6 A PROTEÍNA ADAM33	23
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS (mAb) UTILIZANDO A TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS	29
4.1.1 Fusão celular e seleção de híbridos	29
4.1.2 Manutenção dos hibridomas	30
4.1.3 Varredura dos hibridomas	30
4.1.4 Diluição Limitante	31
4.1.5 Produção de anticorpos monoclonais em larga escala	31
4.1.6 Purificação do anticorpo monoclonal	31
4.2 REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA - ELISA	32
4.3 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS OU WESTERN BLOT (WB)	33
4.4 CULTIVO DAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	33
4.5 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE ADAM33 EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	34
4.6 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33.....	34
4.7 CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33	35
4.7.1 Avaliação da diluição do Anticorpo monoclonal purificado	35
4.7.2 Isotipagem do anticorpo monoclonal selecionado	35
4.7.3 Sequenciamento das regiões hipervariáveis de Cadeia Leve (VL) e Cadeia Pesada (VH) de imunoglobulinas (IgG) do hibridoma secretor	35
4.8 IMUNOHISTOQUÍMICA	37
4.8.1 Imunocitoquímica das Linhagens Tumoraes de Mama	37
4.8.2 Imunohistoquímica das Amostras de Tumores de mama.....	37
4.9 DETERMINAÇÃO DO ESCORE DE ADAM33 NAS AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA	38
4.10 CORRELAÇÃO ENTRE O ESCORE DE ADAM33 NOS TUMORES DE MAMA E OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES	39
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1 CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS	41
5.2 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33.....	42
5.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL	45
5.4 CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	48
5.5 DETERMINAÇÃO DO ESCORE DE ADAM33 NAS AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA	51
5.6 CORRELAÇÃO ENTRE O ESCORE DE ADAM33 NOS TUMORES DE MAMA E OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES	52
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	67
BIBLIOGRAFIA	68


1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres, com incidência mundial crescente. Este tipo de câncer representa nos países ocidentais uma das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas indicam o aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres (INCA, 2014).

No Brasil, a incidência do carcinoma de mama é semelhante à dos países desenvolvidos. De acordo com as estimativas 2016 de incidência de câncer no Brasil fornecidas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama seria o mais incidente entre as mulheres, com 57.900 novos casos e com um risco estimado de 57 casos a cada 100 mil mulheres (FIGURA 1) (INCA, 2016).

FIGURA 1 - ESTIMATIVA BRASILEIRA DE NOVOS CASOS DE CÂNCER EM MULHERES PARA O ANO DE 2016

 Mulheres	Localização primária	casos novos	%
	Mama Feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do Útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do Útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

FONTE: Modificado de INCA (2016).

O número de casos novos estimados para os anos de 2014 e 2015 no Brasil eram de 52.120 ao ano, representando cerca de 20 % de todos os casos de câncer (INCA, 2014). As novas estimativas publicadas recentemente, mostram um aumento

de cerca de 8 % da incidência para o câncer de mama em mulheres, de 20 % para 28%, de todos os tipos de câncer. Mostrando que o câncer de mama é um grande problema de saúde pública no Brasil (INCA, 2016).

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea, que envolve variações morfológicas e clínicas, sendo o resultado de alterações genéticas e epigenéticas (WEIGELT, GEYER, AND REIS-FILHO 2010; LOPEZ-GARCIA *et al.* 2010; ESWARAN *et al.* 2012).

As metástases são a causa de morte em 90% dos pacientes com câncer. Ainda não é possível prever o risco de desenvolvimento de metástases, no câncer de mama, por isso no momento, mais de 80% das pacientes com diagnóstico de câncer recebem terapia adjuvante e, apesar disso, em 40% dessas ocorre recidiva e morte devido às metástases em um período de cinco anos (WEIGELT; PETERSE; VAN 'T VEER, 2005; SETHI; KANG, 2011). A trajetória natural das neoplasias malignas representa os eventos envolvidos na carcinogênese, crescimento, progressão e disseminação do tumor.

Segundo Hanahan e Weinberg (2011), os cânceres podem ser caracterizados por mudanças moleculares que acabam por gerar a manifestação de dez alterações celulares essenciais e comuns à maioria dos carcinomas tais como a (1) autossuficiência em fatores de crescimento, a (2) insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento, a (3) evasão das células à morte por apoptose, o (4) potencial replicativo ilimitado, a (5) angiogênese sustentada e (6) invasão tecidual e metástase, (7) instabilidade genômica, (8) promoção de inflamação, (9) a reprogramação da energia metabólica pela célula tumoral para suportar o contínuo crescimento e proliferação e (10) a evasão ativa das células tumorais às células do sistema imune (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Essa heterogeneidade contudo, não pode ser explicada apenas por parâmetros clínicos, tais como o tamanho do tumor, o envolvimento dos linfonodos, grau histológico, idade, ou por biomarcadores como receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2), rotineiramente utilizadas no diagnóstico e tratamento de pacientes (SIMPSON *et al.*, 2005; EROLES *et al.*, 2011; NAXEROVA; JAIN, 2015; DAI *et al.*, 2016). A necessidade de conhecer mais sobre a doença desencadeou um grande crescimento na pesquisa sobre a biologia molecular do câncer de mama. Avanços nas tecnologias têm permitido aos pesquisadores investigar a natureza do câncer de mama, revelando que

essa doença requer a interligação de várias vias de sinalização e que, tanto o microambiente celular, as características inatas do paciente e a fisiopatologia da doença influenciam no tempo de sobrevida e também na resposta ao tratamento (SIMPSON et al., 2005; EROLES et al., 2011; NAXEROVA; JAIN, 2015; DAI et al., 2016) (SIMPSON et al., 2005; VALLEJOS et al., 2010; EROLES et al., 2011)

1.2 MARCADORES PROGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS

Os fatores biológicos tumorais traduzem o estágio de desenvolvimento neoplásico, caracterizado pela medida do tumor; o crescimento pela atividade mitótica e a capacidade metastática e comprometimento axilar e metástase à distância (CARTER; ALLEN; HENSON, 1989; LYMAN et al., 2014), traduzidos pelo tamanho tumoral, grau e tipo histológico, e condição linfonodal. Além desses, os RE, RP e HER2, como já mencionados, formam o grupo de fatores prognósticos e preditivos, pois continuam direcionando as decisões terapêuticas (SINGLETERARY, 2003; KOBOLDT et al., 2012; BERGEN et al., 2016; KOS et al., 2016).

O tamanho tumoral é uma das variáveis mais significantes do câncer de mama e representa uma aproximação do volume real do tumor. Mulheres com carcinomas mamários de maior dimensão mostraram menor sobrevida e uma maior relação com o surgimento das metástases axilares. A graduação histológica é uma estimativa da diferenciação tumoral da porção invasiva do tumor. O grau histológico é um importante fator prognóstico e está relacionado às metástases axilares e sistêmicas, à recidiva tumoral e ao menor intervalo livre de doença (CARTER; ALLEN; HENSON, 1989, SINGLETERARY, 2003; KOBOLDT *et al.* 2012). O sistema de avaliação do grau tumoral mais utilizado para o câncer de mama, é o *Nottingham Histologic Score System* (classificação Scarff-Bloom-Richardson (SBR) e modificada por Elston-Ellis). Este sistema engloba o grau nuclear, o arquitetural e a contagem de mitoses. Pela soma dos escores de 1 a 3 para cada critério, o grau tumoral é categorizado em I, II e III, correspondendo à bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciados, respectivamente (ELSTON AND ELLIS, 1991).

A marcação de proliferação pela imunohistoquímica do tumor representa uma medida estática da proliferação e os alvos são as células em mitose e os núcleos em prófase. O marcador utilizado para avaliar a proliferação denominado Ki-67 é um marcador específico para células em fase G1, G2 e mitose, estando ausente nas

células em fase G0. Este marcador mostra associação significativa com o grau histológico, observando-se maior positividade em tumores pouco diferenciados (DOWSETT et al., 2011; SATO et al., 2014; KOS et al., 2016).

O entendimento do prognóstico no câncer de mama é complexo, pois é necessário o conhecimento dos mecanismos da heterogeneidade e da biologia tumoral. Os fatores prognósticos morfológicos ainda são essenciais no diagnóstico histopatológico do câncer de mama, porém, é necessária a adição de outros fatores que podem interagir ou ter valor preditivo, para definição da evolução clínica e terapêutica.

1.3 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA

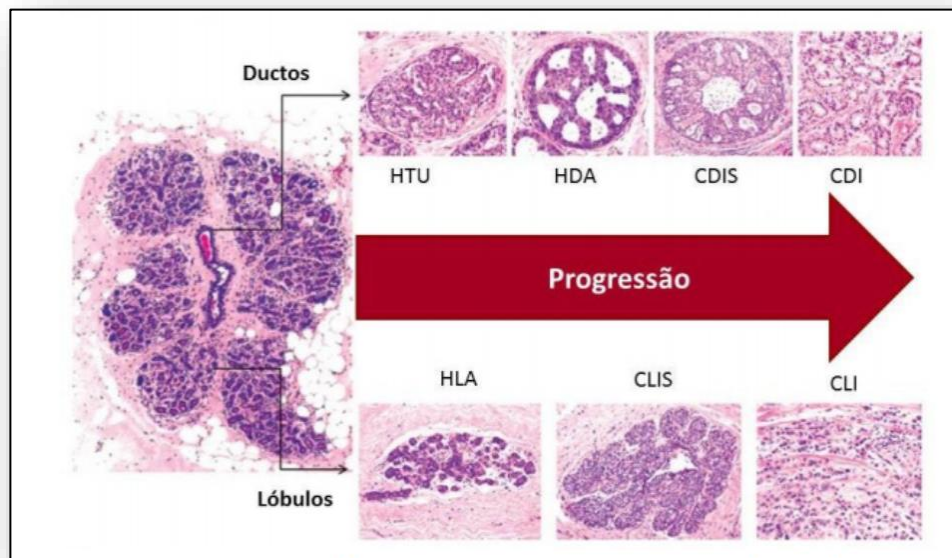
Os ductos mamários femininos iniciam intensa proliferação e diferenciação na puberdade. Sob influência hormonal, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas unidades terminais ducto lobular (TDLU), localizadas na porção final dos ductos. Elas, por sua vez, dão origem às ramificações ductais que culminam com a formação das unidades ducto-lobulares terminais, consideradas as unidades funcionais da mama. Elas possuem uma camada externa de células mioepiteliais que ejetam leite durante a lactação e uma camada de células luminais no revestimento interno. Dentre as células luminais, existem as ductais, que revestem os ductos (função absorviva e de revestimento), e as alveolares, as quais produzem o leite materno (função secretória) (MENKE et al., 2006).

Os ductos são revestidos por 1 a 2 camadas de células luminais cilíndricas. A porção lobular-alveolar é revestida por uma a duas camadas de células cúbicas com capacidade secretora. Uma camada de células mioepiteliais localiza-se em íntimo contato com a membrana basal do epitélio alveolar e dos ductos menores. Apresentam positividade para marcadores imunohistoquímicos de origem tanto epitelial quanto mesenquimal, tais como as citoqueratinas 5, 6, 14 e 17. As células mioepiteliais basais possuem ainda capacidade contrátil e são responsáveis pela renovação do epitélio luminal. Os altos níveis de colagenase do tipo IV contribuem com os processos de renovação da membrana basal e remodelação das glândulas. A mama sofre alterações estruturais associadas com o ciclo menstrual, gestação, lactação e menopausa. O entendimento destas mudanças estruturais normais são

necessárias para a distinção entre um processo fisiológico e os estados patológicos da mama (MENKE et al., 2006).

Cerca de 95% das malignidades mamárias são adenocarcinomas. Estes, por sua vez, são divididos em carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos, mostrados na FIGURA 2. O carcinoma *in situ* se refere a uma proliferação neoplásica que está limitada aos ductos e aos lóbulos pela membrana basal. Já o carcinoma invasivo é aquele que atravessou a membrana basal e alcançou o estroma (YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007).

FIGURA 2 - MODELO HISTOLÓGICO DO DESENVOLVIMENTO E EVOLUÇÃO DO CÂNCER DE MAMA.



FONTE: Modificado de LOPEZ-GARCIA et al. (2010)

HTU: hiperplasia do tipo usual. HDA: hiperplasia ductal atípica. CDIS: carcinoma ductal *in situ*. CDI: carcinoma ductal invasor. HLA: hiperplasia lobular atípica. CLIS: carcinoma lobular *in situ*. CLI: carcinoma lobular invasor.

Os carcinomas do tipo ductal e o lobular são os tipos histológicos de câncer de mama mais frequentes na população, podendo se apresentar *in situ* ou invasivo (TURASHVILI et al., 2007; YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010; RAOUF et al., 2012). Esses dois tipos de carcinomas são derivados das unidades terminais ducto-lobulares (TDLU) e as diferenças na morfologia são o reflexo dos mecanismos carcinogênicos (TURASHVILI et al., 2007; LOPEZ-GARCIA et al., 2010; RAOUF et al., 2012). A apresentação dos parâmetros

clínicos patológicos tais como local do tumor, grau e tamanho são semelhantes para ambos os tipos de tumor, porém, os dados clínicos e o padrão de metástases sugerem que o seu desenvolvimento e a progressão sejam diferentes. No carcinoma ductal invasivo as metástases são frequentes nos pulmões, cérebro, ossos e fígado enquanto que no carcinoma lobular invasivo as metástases ocorrem geralmente no trato gastrointestinal, peritônio e retroperitônio (YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007; LOPEZ-GARCIA et al., 2010; CARCOFORO; RAIJI; LANGAN, 2012; RAOUF et al., 2012).

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) consiste de uma população clonal maligna de células limitadas aos ductos pela membrana basal (FIGURA 2). Representa a forma inicial, não invasiva e com bom prognóstico do carcinoma ductal. Dentre os cânceres diagnosticados por mamografia quase metade são CDIS, muitos detectados como microcalcificações, compreendendo cerca de 15% a 30% de todos os cânceres (YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007; VIRNIG et al., 2009). O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) é sempre um achado incidental de biópsia, já que não está associado à calcificação ou reação estromal que produzem densidades mamográficas. Os CLIS apresentam-se entre 1% a 6% de incidência de todos os carcinomas, representando um fator de alto risco para o desenvolvimento do carcinoma invasor de mama (SIMPSON et al., 2005; GOMES et al., 2011)

O carcinoma ductal invasivo (CDI) por sua vez, correspondente a aproximadamente 75% dos carcinomas de mama e são caracterizados pela formação de túbulos ou ductos que se infiltram no parênquima mamário (YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010). Aproximadamente 20% dos CDIs podem ser categorizados em subtipos específicos tais como tubular, medular, mucinoso, papilar, micropapilar ou metaplásico. Cada subtipo é definido por características histopatológicas e citológicas únicas. Os 80% restantes de CDIs não são subclassificados histopatologicamente, sendo chamados carcinomas ductais “sem outra especificação” ou “nenhum tipo específico” (YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010).

O carcinoma lobular invasivo (CLI) compreende 10-15% de todos os carcinomas de mama (BIGLIA et al., 2007; YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007; KRISTIANSEN; PILARSKY, 2008; XING et al., 2010; CAO et al., 2012; CHRISTGEN; DERKSEN, 2015). Apresenta-se como uma massa palpável ou uma densidade mamográfica com bordos irregulares, em um quarto dos casos o tumor infiltra-se

difusamente no tecido, por isso as metástases também são difíceis de detectar (BIGLIA et al., 2007; YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007; KRISTIANSEN; PILARSKY, 2008; CAO et al., 2012). Os aspectos histopatológicos que descrevem os exemplos clássicos de lesões lobulares são populações de pequenas células aberrantes com pequenos núcleos, ácinos individuais e falta de coesão entre as células. Os nucléolos geralmente não são visíveis, as mitoses são raras ou esparsas na maioria dos casos. O padrão de crescimento é distinto, com arranjo linear de células localizadas entre feixes de colágeno formando as chamadas “filas indianas” (FIGURA 2) (NISHIZAKI et al., 1997; BANE et al., 2005). A principal característica molecular específica descrita dos carcinomas lobulares invasivos e carcinomas lobulares *in situ* é a perda ou hipo-expressão de E-caderina (gene *CDH1*). Vários estudos demonstram as alterações do padrão normal de expressão da E-caderina em vários tipos de câncer humano (BERX; VAN ROY, 2001). No câncer de mama, de um modo geral, há perda parcial ou total da expressão de E-caderina correlacionada com a perda de características de diferenciação (BERX; VAN ROY, 2001; BANE et al., 2005; HARIGOPAL et al., 2005; KASHIWAGI et al., 2011; WELLS; PIPA; SHIN, 2014).

1.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

Tumores de mama com o mesmo tipo histológico podem variar na resposta terapêutica e nas curvas de sobrevida. Perou *et al.* (2000) e Sorlie *et al.* (2001) propuseram uma classificação molecular dos tumores de mama, classificando os carcinomas em classes moleculares, que mostram características gênicas semelhantes, a partir de uma abordagem molecular, utilizando análises da expressão gênica de amostras de tumores de mama (PEROU et al., 2000; SØRLIE et al., 2001). Esses ensaios gênicos podem agrupar tumores distintos em subtipos com evoluções clínicas semelhantes e identificar novos fatores prognósticos e alvos terapêuticos.

O primeiro nível de classificação separou tumores positivos e negativos para o receptor de estrógeno (RE), porque a maior diferença no perfil global de expressão gênica foi observada entre esses dois fatores.

Os tumores receptores positivos são geralmente bem diferenciados e as pacientes mostram melhor evolução clínica, quando comparadas com os tumores receptores negativos. Cerca de 60-75% dos carcinomas são receptores de estrógeno positivos, no entanto, apenas 2/3 respondem a terapia com inibidor de estrógeno

(tamoxifeno). A resistência a terapia hormonal se deve a diversas formas de resistência já descritas, a mais frequente, é a perda da expressão da isoforma RE α , como também, a expressão de variações transcricionais do RE. Pode ainda acontecer diversas alterações como fosforilação, metilação, ubiquitinação e modificações pós-transcricionais do RE que influenciarão na atividade e sensibilidade das terapias hormonais. Como também, a ativação do RE de forma independente de ligante, como consequência de ativação por receptores como HER2, receptor de fator epidermal (EGFR) e receptor de fator de crescimento insulina-símile (IGFR) (OSBORNE et al., 2013; ZHAO; RAMASWAMY, 2014; ANBALAGAN; ROWAN, 2015; HUANG; WARNER; GUSTAFSSON, 2015).

A expressão dos RE e RP tem valor prognóstico e preditivo para o intervalo livre de doença e sobrevida global. O câncer de mama com receptores negativos mostra altos índices proliferativos, maior grau histológico e capacidade invasiva por causa da expressão alterada de fatores de crescimento epidérmico (PARKER et al., 2009; KOS et al., 2016).

Após a abordagem iniciada por Perou e Sorlie (PEROU et al., 2000; SØRLIE et al., 2001), surgiram inúmeros estudos que tentam elucidar o comportamento tumoral, e identificar proteínas que estão sendo expressas e relacionadas com o desenvolvimento e agressividade do câncer de mama. Estes estudos procuraram correlacionar os subtipos de carcinoma de mama com parâmetros clínicos relevantes, como o tempo de sobrevida e o tempo livre de doença.

A classificação molecular consiste em uma classificação intrínseca de subtipos de câncer de mama, que podem ser do tipo Luminal A, Luminal B, HER2 e Basalóide.

Os subtipos luminais representam cerca de 75% dos tumores mamários com expressão de proteínas típicas de células luminais epiteliais como RE e RP. O subtipo **Luminal A**, é o mais frequente, apresenta prognóstico favorável, possuindo o benefício de terapia alvo dirigida, pois expressa RE e/ou RP. Outra característica, é a expressão de citoqueratinas 7, 8, 18 e 19, proteínas do citoesqueleto, classicamente de células epiteliais luminais. Apresenta elevada expressão de genes relacionados às células luminais, como pelo baixo grau histológico, negatividade para HER2 e baixa taxa proliferativa (Ki-67<14%) (SØRLIE et al., 2001; EROLES et al., 2011; DAI; CHEN; BAI, 2014; CHEANG et al., 2015; DAI et al., 2016).

O subtipo **Luminal B**, quando comparado ao subtipo A, apresenta baixa ou moderada expressão de genes das células luminais as citoqueratinas (CK) 7, 8, 18 e 19 e maior grau histológico, podendo ou não ser positivo para HER2. Observa-se ainda que esses tumores mostram elevada expressão do Ki-67, marcador utilizado para avaliar a proliferação. Diversos estudos mostram relação inversa entre a expressão deste marcador e sobrevida total e sobrevida livre de doença (SØRLIE et al., 2001; SATO et al., 2014; CHEANG et al., 2015; DAI et al., 2016). Os tumores Luminais A e B, por serem RE e RP positivos, apresentam boa resposta a terapia hormonal.

O subtipo **HER2** foi caracterizado pela amplificação do gene HER2, que são expressos nas células progenitoras, células mais indiferenciadas e ocorre com uma frequência de 10% na população. A amplificação do oncogene HER2, e concomitantemente a superexpressão de sua proteína, é atualmente implicada como um importante biomarcador de mau prognóstico no carcinoma de mama (SØRLIE et al., 2001; KOBOLDT et al., 2012). As pacientes HER2 positivo contam com o benefício da terapia com transtuzumab, um anticorpo monoclonal (SØRLIE et al., 2001; KOBOLDT et al., 2012; CHEANG et al., 2015; DENDULURI et al., 2016).

O subtipo **Basalóide** (*Basal-like*) (BLBC) foi caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais (SØRLIE et al., 2001). Este fenótipo mostra positividade para CK 5/6, 14 e 17, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que são proteínas expressas nas células basais/mioepiteliais (SØRLIE et al., 2001; ABD EL-REHIM et al., 2004; NIELSEN et al., 2004; CHEANG et al., 2008; NASSAR et al., 2012; PARK et al., 2014; BIANCHINI et al., 2016; DAI et al., 2016).

Durante a carcinogênese há alterações na expressão normal das CKs, com perda de expressão de algumas delas ou expressão anormal, sendo relacionadas ao comportamento biológico de diversos tumores. As CKs, nas células tumorais, interferem no controle do ciclo celular, favorecendo a proliferação, conferindo às células neoplásicas maior plasticidade e maleabilidade, aumentando sua capacidade de invasão da membrana basal e estroma adjacente, de penetração na parede dos vasos e de geração de metástases à distância (ABD EL-REHIM et al., 2004; NASSAR et al., 2012; INANC et al., 2014; DAI et al., 2016).

O EGFR é uma proteína de membrana plasmática, e funciona como receptor do tipo tirosina-quinase. O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um peptídeo que

induz a proliferação celular pela ativação do EGFR, o qual tem um domínio tirosina quinase citoplasmática, um domínio único transmembrana e um extracelular envolvido na ligação do EGF e dimerização do receptor. A ativação de EGFR leva a ativação da proliferação celular, angiogênese, invasão, metástase e inibição da apoptose. A amplificação do gene *EGFR* tem sido descrita em vários tumores, inclusive no câncer de mama, sendo um dos mecanismos de super-expressão do gene, é altamente variável e encontrado em até 24% dos tumores. A mutação do gene *EGFR*, também, é um dos mecanismos de ativação relatados, embora sendo raro, um estudo recente relatou que está presente em 11% dos carcinomas triplo-negativos (TNG) (NASSAR et al., 2012; PARK et al., 2014; HOLDMAN et al., 2015; BIANCHINI et al., 2016; DAI et al., 2016; NAKAI; HUNG; YAMAGUCHI, 2016).

O subtipo basalóide faz parte dos tumores denominados TNG que são caracterizados pela ausência da expressão do RE, RP e HER2. Cerca de 80% dos carcinomas TNG são carcinomas basalóides (BLBC), além da ausência dos RE, RP e HER2, eles expressam proteínas características de células basais (EGFR, CK 5/6, CK 14 e CK 17). Este perfil está associado com pior prognóstico e não possui um alvo terapêutico definido como os outros subtipos já descritos. Portanto, não responde ao tratamento com drogas anti-estrogênicas nem com o anticorpo monoclonal trastuzumab (PARK et al., 2014; BIANCHINI et al., 2016; DAI et al., 2016; NAKAI; HUNG; YAMAGUCHI, 2016).

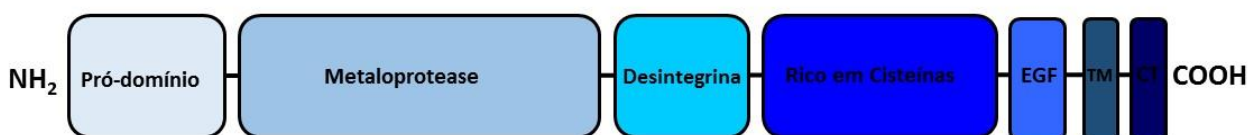
Apesar dos grandes avanços na pesquisa, os ensaios com base em expressão de genes não estão prontamente disponíveis em todo o mundo devido ao seu alto custo e dificuldade técnica (NIELSEN et al., 2004; BLOWS et al., 2010; DAI et al., 2015). A partir destes estudos moleculares, vários estudos surgiram na tentativa de reproduzir essa classificação por imunohistoquímica, utilizando um painel de marcadores moleculares, RE, RP, HER2, EGFR e CK5/6, e classificando em quatro subgrupos moleculares básicos, de uma forma semelhante aos definidos pelos perfis genéticos (NIELSEN et al., 2004; CHEANG et al., 2008; BLOWS et al., 2010; DAI et al., 2015).

1.5 FAMÍLIA DE PROTEÍNAS ADAM

As ADAMs são proteínas transmembranas do tipo I que possuem uma estrutura comum que inclui pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio

desintegrina, região rica em cisteína, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), domínio transmembrana e cauda citoplasmática (FIGURA 3). O nome ADAM refere-se aos dois domínios potenciais desta família de proteínas: o domínio metaloprotease e o domínio desintegrina (“A Disintegrin And Metalloprotease”) (SEALS; COURTNEIDGE, 2003; HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005; ARRIBAS, BECH-SERRA, SANTIAGO-JOSEFAT, 2006).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS ADAMs



FONTE: O AUTOR (2016)

Estrutura das proteínas ADAMs, constituídas de pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio desintegrina, rico em cisteínas, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), domínio transmembrana (TM) e cauda citoplasmática (CT).

As ADAMs estão envolvidas em diversos processos biológicos normais, tais como interações espermatozóide-óvulo, diferenciação celular, migração celular, crescimento axonal, desenvolvimento muscular e aspectos relacionados à imunidade (SEALS; COURTNEIDGE, 2003; ARRIBAS, BECH-SERRA, SANTIAGO-JOSEFAT, 2006; REISS; SAFTIG, 2009). O envolvimento de alguns membros da família também tem sido intensamente descrito em processos patológicos, como inflamação, artrite reumatóide, hipertrofia cardíaca, asma, Alzheimer e câncer. Até o momento 40 membros da família ADAM foram identificados em várias espécies como fungos filamentosos, leveduras (*Schizosaccharomyces pombe*), nematódeos (*Caenorhabditis elegans*), *Drosophila melanogaster* e vertebrados (EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008; MURPHY, 2008; REISS; SAFTIG, 2009; DUFFY et al., 2011) (DUFFY et al., 2011; EDWARDS et al., 2008; REISS & SAFTIG, 2009).

No genoma humano foram descritos 22 genes da família ADAM (EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008; MULLOOLY et al., 2015; TAKEDA, 2016). Estas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático e seguem para maturação no Golgi, um processo de ativação dependente de protease tipo furina, o qual consiste na clivagem e remoção do pró-domínio (WHITE, 2003). O domínio metaloprotease

para ser ativo depende da presença da sequência consenso de aminoácidos HEXGHXXGXXHD. Os membros ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 e 33, que possuem a sequência consenso ativa de metaloproteases, têm um papel biológico importante no processamento (clivagem, ativação e liberação de ectodomínios - atividade de *shedase*) de proteínas da superfície celular e proteólise de componentes da matriz extracelular (REISS; SAFTIG, 2009). Estes processos são críticos no remodelamento da superfície celular, na regulação da disponibilidade de fatores de crescimento e na modulação da capacidade das células de responderem a estímulos extracelulares (WHITE, 2003; DUFFY et al., 2011). Algumas proteínas da família ADAM possuem sequências diferentes neste domínio e, apesar de estruturalmente similares, o sítio catalítico não é ativo nestas proteínas ADAMs: 2, 7, 11, 18, 22, 23, 29 e 32 (HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005; REISS; SAFTIG, 2009; TAKEDA, 2016) .

O domínio desintegrina tem função de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular contribuindo como ligante de integrinas na superfície celular

(ETO et al., 2002; HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005; ARRIBAS, BECH-SERRA, SANTIAGO-JOSEFAT, 2006). Os domínios desintegrina das ADAMs 1, 2, 3, 9, 12 e 15 ligam-se à integrina $\alpha 9 \beta 1$ promovendo a adesão celular (ETO et al., 2000; ETO et al., 2002). O domínio desintegrina de ADAM23 demonstrou uma adesão mediada por $\alpha \nu \beta 3$ (SEALS; COURTNEIDGE, 2003; VERBISCK, N. M.; COSTA, E. T.; COSTA, 2009). O domínio desintegrina e a região rica em cisteína da ADAM12 ligam-se à integrina $\alpha 7 \beta 1$ e esta interação promove a adesão celular (HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005; MOCHIZUKI; OKADA, 2007). Huang e colaboradores (2005) demonstraram que distintas ADAMs podem modular tanto positivamente quanto negativamente a migração celular pela interação específica com integrinas. A exemplo, a ADAM12 inibiria a migração de células mediada por $\alpha 4 \beta 1$, mas não por $\alpha 5 \beta 1$ e, a ADAM17 possui o efeito inverso. As ADAMs 19 e 33 inibem a migração mediada pelas integrinas $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha 5 \beta 1$ (HUANG et al., 2005).

O domínio rico em cisteínas tem sua função ainda pouco esclarecida, havendo hipóteses de que possa regular o domínio catalítico através da ligação ao substrato, atuando na regulação da atividade biológica das ADAMs. Esse domínio também possui propriedade adesiva, podendo interagir com outros domínios ricos em cisteínas e promovendo assim, fusão de membranas celulares (IBA et al., 2000; SMITH et al., 2002; WHITE, 2003; ZHONG et al., 2008).

A literatura destaca uma importante participação das proteínas da família ADAM nos processos de formação e progressão tumoral. Vários membros dessa família de proteínas ADAM que incluem ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17 e ADAM23 já foram implicadas na patogênese e progressão do câncer, o que ocorre via clivagem de diferentes componentes, migração celular e no controle de várias sinalizações envolvidas no desenvolvimento tumoral (IBA et al., 1999; O'SHEA et al., 2003; COSTA et al., 2004, 2014; ZHONG et al., 2008; TOQUET et al., 2012; FELDINGER et al., 2014; CAIAZZA et al., 2015; MULLOOLY et al., 2015).

1.6 A PROTEÍNA ADAM33

A proteína ADAM33 contém todos os domínios característicos da família ADAM, incluindo a sequência consenso de ligação ao zinco no sítio catalítico, que é ativo em todas as isoformas dessa proteína. A proteína imatura de aproximadamente 120 kDa e é processada a uma forma madura glicosilada de aproximadamente 100 kDa. A proteína ADAM33 está localizada no citoplasma (~84%), preferencialmente no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, sendo que menos de 10% dela está localizada na membrana plasmática, incluindo ambas as formas imatura e madura (GARLISI et al., 2003; POWELL et al., 2004).

Estudos recentes demonstraram a presença de uma forma solúvel da ADAM33 (sADAM33), de 55 kDa no meio extracelular em lavado bronco-alveolar com aparente capacidade de promover a angiogênese (PUXEDDU et al., 2008). Diversos polimorfismos do gene *ADAM33* têm sido fortemente relacionados à asma (EERDEWEGH et al., 2002). Essas evidências têm sido confirmadas em diversos estudos (CAKEBREAD et al., 2004; HAITCHI et al., 2005; HOLGATE et al., 2005; PARKER et al., 2009; KOBOLDT et al., 2012).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *ADAM33* em crianças e adultos podem modificar a susceptibilidade individual para o desenvolvimento da asma de forma mais severa (EERDEWEGH et al., 2002; HOLGATE et al., 2005; HAITCHI et al., 2005; Davies, 2009). A asma é uma doença inflamatória associada com alterações na arquitetura normal das paredes das vias aéreas remodelando-as. As alterações relacionadas ao gene *ADAM33* na asma promovem a perda da função pulmonar devido ao remodelamento tecidual (CAKEBREAD et al., 2004; HAITCHI et al., 2005; HOLGATE et al., 2005; PARKER et al., 2009) por mecanismos ainda

incertos. Sabe-se que a ADAM33 é expressa nos fibroblastos pulmonares e no músculo liso brônquico, porém, a expressão nas células epiteliais é controversa. Dijkstra *et al.*, (2009) descrevem a expressão de ADAM33 em células epiteliais basais brônquicas, e seu possível papel no remodelamento tecidual, relacionam a proteína ADAM33 e outras ADAMs, com a clivagem de c-Kit e a manutenção da doença.

Em 2008, Yang e colaboradores descobriram que o gene ADAM33 está silenciado nas células epiteliais por metilação do seu promotor. Yang *et al.*, (2012) mostraram que a regulação do gene ADAM33 em fibroblastos pulmonares em asmáticos envolve mecanismos epigenéticos, com a modificação de histonas e condensação de cromatina, mas não metilação do DNA, sendo que estes mecanismos parecem ser controlados pelo TGF- β .

A ADAM33 foi relacionada com a doença inflamatória pulmonar, de etiologia viral, em crianças de até 1 ano de idade, que evoluíram ao óbito. Baurakiades et al (2014) avaliaram a proteína em tecidos parafinizados de pulmão, por imunohistoquímica (IHQ). A expressão da proteína ADAM33 estava aumentada, em relação ao tecido normal, sugerindo que a proteína estivesse relacionada com o remodelamento do tecido pulmonar e a fibrose tecidual após infecção viral, processo responsável pela alta morbidade e mortalidade de crianças que apresentaram pneumonia viral (BAURAKIADES et al., 2014).

A ADAM33, como outras ADAMs, parece estar relacionada com adesão celular, possuindo a habilidade de inibir a migração celular mediada pelas integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ (HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005).

A relação entre ADAM33 e o câncer gástrico foi discutida por Kim *et al.* (2009), que utilizaram silenciamento de ADAM33 por siRNA. A ausência de ADAM33 resultou na redução da proliferação e migração de células tumorais SNU-601 em cultivo.

Holloway et al. (2010) relatam que a ADAM33 está relacionada com a patogênese da aterosclerose. Essa doença envolve inúmeros eventos incluindo o acúmulo de LDL nas artérias, adesão de leucócitos no endotélio vascular, com subsequente, migração desses leucócitos através do endotélio, migração de células musculares lisas da camada média para íntima e aumento da produção de proteínas da matriz extracelular. Esses eventos em conjunto com moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento e a matriz extracelular propiciam a formação da placa de aterosclerose. Foi demonstrado que ADAM33 está envolvida no processo de inibição da migração de células da musculatura lisa e isso poderia promover o

desenvolvimento de placas ateroscleróticas instáveis. Além disso, detectaram uma associação entre SNPs do gene *ADAM33* e a extensão da aterosclerose em pacientes com doença arterial coronariana (HOLLOWAY et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O Grupo de estudos em Epigenômica/CNPq estuda novos marcadores moleculares em câncer de mama desde de 2005, e o gene *ADAM33* vem sendo um dos alvos de estudo. Em nosso primeiro trabalho, analisamos o gene *ADAM33* utilizando um painel de linhagens tumorais de mama. O gene apresentou expressão diminuída devido a hipermetilação do promotor do gene *ADAM33*. A partir dos dados de sequenciamento de linhagens que expressam ou não o gene *ADAM33*, foram planejados iniciadores apropriados para utilizar a técnica de MSP (methylation specific PCR) em tumores. Assim, foi possível realizar a mesma análise iniciada com as linhagens, nos tumores primários de mama. Foram utilizadas 76 amostras de tumores de mama, sendo que destas, 51 amostras eram de carcinoma ductal invasivo (CDI) e 21 de carcinoma lobular invasivo (CLI). Foi demonstrado uma diferença significativa nos carcinomas lobulares invasivos, onde 76,2% destes apresentavam o promotor do gene *ADAM33* hipermetilado ($p = 0,0002$) (SENISKI *et al.*, 2009).

Observamos, além disso, nesses resultados, uma expressão variada do gene *ADAM33* nas linhagens tumorais de câncer de mama, das quais, todas são provenientes de carcinomas ductais invasores, o que nos encorajou a examinar a expressão desta proteína no câncer de mama.

A biologia molecular, vem auxiliando a desvendar os passos utilizados ou as vias de ativação intracelular que conduzem ao câncer de mama. Sabe-se a bastante tempo que não existe um caminho único, mas como uma série complexa de acontecimentos moleculares que levam para vias distintas e divergentes em relação ao câncer de mama invasivo (SIMPSON *et al.*, 2005).

Apesar dessas novas técnicas moleculares possibilitarem informações de grande valor para o entendimento da biologia tumoral, são técnicas de alto custo e pouca aplicabilidade na prática clínica. Técnicas que fogem da realidade na maior parte dos centros que tratam pacientes com câncer de mama. O uso de técnicas de imunohistoquímica vem possibilitando a identificação de subtipos moleculares descritos nos estudos de análise da assinatura genética, de fundamental importância, principalmente quando consideramos as limitações econômicas encontradas em países como o Brasil.

A validação da proteína ADAM33 como biomarcador molecular de câncer de mama depende de sua utilização em imunohistoquímica. Por essa razão, em

continuidade ao trabalho iniciado em 2009 com o gene *ADAM33*, foi realizada a clonagem de uma parte desse gene, expresso um domínio da proteína ADAM33 recombinante e produzido anticorpos policlonais. Os anticorpos produzidos foram utilizados em amostras de tumores em parafina através da técnica de imunohistoquímica (IHQ) em *tissue micro array* (TMA) e ficou caracterizado o potencial de utilização da proteína ADAM33 como biomarcador de carcinoma mamário (MANICA *et al*, 2013).

Por isso, o objetivo do presente estudo foi, em continuidade aos estudos anteriores, produzir um anticorpo monoclonal contra ADAM33 para avaliar a expressão da proteína ADAM33 no câncer de mama e determinar a sua correlação com as características clínico-patológicas e o prognóstico das pacientes com câncer de mama. O painel de imunohistoquímica foi escolhido para incluir marcadores específicos de câncer de mama que são bem estabelecidos como marcadores que identificam os subtipos moleculares de câncer de mama.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi produzir o anticorpo-monoclonal anti-ADAM33 para avaliar a expressão da proteína ADAM33 no câncer de mama e determinar se ADAM33 pode ser um novo biomarcador de câncer de mama através da relação da expressão dessa proteína com os dados clínico patológicos e o prognóstico das pacientes.

Para isso, os objetivos específicos foram:

- Produzir e purificar anticorpos monoclonais anti-ADAM33.
- Testar a especificidade dos anticorpos monoclonais utilizando linhagens tumorais de mama.
- Selecionar um anticorpo monoclonal específico para a proteína ADAM33 humana.
- Caracterizar o hibridoma secretor do anticorpo monoclonal e solicitar o depósito da patente.
- Padronizar um escore de leitura da proteína ADAM33 em câncer de mama utilizando o anticorpo monoclonal como marcador.
- Testar o anticorpo monoclonal para avaliar o padrão de expressão da proteína ADAM33 em tumores de mama preservados em parafina e dispostos em lâminas de vidro (*Tissue micro array*).
- Correlacionar a expressão de ADAM33 no câncer de mama com os dados clínico patológicos dessas pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS (mAb) UTILIZANDO A TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS

4.1.1 Fusão celular e seleção de híbridos

Dois camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus*, linhagem Balb/c, previamente imunizados com a proteína ADAM33 recombinante (ADAM33-Rec) (MANICA *et al.*, 2013) e com a confirmação da produção de anticorpos policlonais contra ADAM33 (MANICA *et al.*, 2013) foram utilizados para produção dos anticorpos monoclonais. Esses animais foram mantidos no biotério setorial do Centro de Ciências Biológicas da UFPR, sob padrão sanitário convencional, com água e alimento à vontade.

Os experimentos envolvendo animais tiveram aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com o certificado número 435 (processo 23075.010136/2010-20). Os animais sacrificados para coleta do baço, foram manipulados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/BIO-UFPR).

Antes da fusão, as células mielóides Ag8xP3653 foram cultivadas em meio de manutenção RPMI 1640 (Gibco), contendo 2 mM de L-glutamina, 20 % de soro fetal bovino (Gibco), 10 µg/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL anfotericina B.

Três dias antes da fusão os animais selecionados foram imunizados via intravenosa com 20 µg da proteína ADAM33-Rec. No dia da fusão, os animais foram sedados e anestesiados, o sangue total foi coletado por punção cardíaca, para obtenção do soro policlonal. Em seguida, o baço desses animais foi retirado assepticamente em fluxo laminar, macerado em meio de manutenção sem soro fetal bovino, para liberação dos esplenócitos. Com auxílio de uma micropipeta, as células foram dissociadas, e o material foi então filtrado em uma seringa contendo uma malha para retenção dos restos teciduais. Após sucessivas lavagens, os esplenócitos coletados do filtrado foram misturados às células de mieloma, em uma proporção de 1:5, célula de mieloma e de esplenócitos. À essa mistura de células foi gotejado polietilenoglicol 50% (Roche) no volume de 10 ml em um minuto (Harlow & Lane 1988). As células foram ressuspensas em volume suficiente de meio de manutenção

e distribuídas 100 µL/poço em placas de 96 poços, na razão de aproximada de $2,5 \times 10^5$ células por poço. Em seguida, foi adicionado 100 µL/poço de meio de cultivo seletivo contendo HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) (diluído 50 vezes). A troca de 50% desse meio foi realizada 2 vezes por semana por 14 dias.

Os esplenócitos que não se fundiram com as células de mieloma morreram em cerca de uma semana. As células de mieloma não fusionadas, também, morrem após esse período, pois, a síntese *de novo* é bloqueada pela aminopterina. Portanto, os hibridomas formados pela fusão entre a célula de mieloma e os esplenócitos (que passam a utilizar a via de salvamento do esplenócito) tiveram a capacidade de sobreviver em meio de cultivo seletivo.

Depois dos primeiros 14 dias com meio HAT, o cultivo prosseguiu por mais 14 dias substituindo 50% do meio com meio HT (hipoxantina e timidina). Esse procedimento manteve elevados os níveis dos intermediários da via de salvamento e foram diluindo a aminopterina. Dessa forma, os hibridomas foram mantidos pelos intermediários até que as diluições sucessivas em meio RPMI fossem suficientes para que a concentração da aminopterina não afetasse mais as células.

Entre o vigésimo e vigésimo primeiro dia após a fusão, os híbridos foram testados para confirmação da produção de anticorpos específicos contra ADAM33-Rec por ELISA.

4.1.2 Manutenção dos hibridomas

As células foram mantidas em meio de manutenção com a mesma periodicidade de troca, cerca de 72 horas, até o fim do período da varredura dos hibridomas.

4.1.3 Varredura dos hibridomas

A presença ou ausência de anticorpos presentes no sobrenadante dos cultivos foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA), descrito a seguir, utilizando a proteína ADAM33-Rec adsorvida a placa. O ensaio foi realizado utilizando 100 µL de sobrenadante do cultivo dos hibridomas como anticorpo primário, como secundário foi utilizado ECL anti-mouse IgG HRP-conjugated (GE) em diluição 1:4000.

Como controle negativo foi utilizado o meio de cultivo para os hibridomas e como controle positivo o soro policlonal do animal 3 na diluição 1:10000.

4.1.4 Diluição Limitante

Após a varredura dos hibridomas, as células positivas para a secreção de anticorpos contra ADAM33-Rec passaram por um processo chamado de diluição limitante. Essa etapa tem por objetivo isolar apenas uma célula secretora de anticorpo, garantindo a produção de um anticorpo monoclonal.

A partir de cada poço positivo, no teste de ELISA, foi realizada a contagem do número de células, e aproximadamente 200 células do hibridoma foram diluídas em 200 µL de meio de cultivo, e distribuídas na linha A de uma placa de 96 poços. Da linha A foram removidos 100 µL que foram diluídos para linha B, e esse processo repetido até a linha H, onde os últimos 100 µL foram removidos e descartados. Desse modo, as células foram diluídas de 100 células/poço até 0,8 células/poço.

Após a diluição limitante, as células foram observadas em microscópio óptico invertido para se garantir o isolamento adequado dos clones. Após a confirmação da existência de clones isolados, esses, foram testados por ELISA, e os clones positivos sofreram nova diluição limitante, para garantir que apenas uma célula originasse uma única colônia produtora de anticorpos.

4.1.5 Produção de anticorpos monoclonais em larga escala

Para a produção dos anticorpos monoclonais em volume maior, cada clone positivo foi expandido em cultura. E a partir dessas culturas, os clones foram congelados em meio contendo DMSO 10% e estocados em nitrogênio líquido para perpetuar cada linhagem híbrida. Os sobrenadantes destas culturas também foram armazenados para testes de especificidade dos anticorpos.

4.1.6 Purificação do anticorpo monoclonal

O anticorpo monoclonal foi purificado por meio de cromatografia por afinidade em Proteína A/G-Sepharose (Sigma). O meio de cultivo, para purificação utilizado nessa etapa, não continha soro fetal bovino (contém imunoglobulinas).

Para isso, o clone selecionado foi cultivado em BD Cell™ MAb Medium Quantum Yield e BD Cell™ Serum Free antes da purificação. O cultivo ocorreu em diferentes frações de meio, variando de 25% a 100% de cada, em um volume total de 3 mL de meio, possibilitando, assim, a adaptação do clone até o cultivo final em 100% de BD Cell™ Serum Free.

4.2 REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA - ELISA

Microplacas descartáveis de poliestireno de 96 poços (Immuno Nunc, Thermo Fisher Scientific) foram utilizadas, e todos os imunoreagentes no volume de 100 µL. Entre todos os passos da reação, as microplacas foram lavadas cinco vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20. Para a sensibilização das placas foram utilizados 10 ng da proteína ADAM33-Rec purificada por poço, diluída em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH 9,6), sendo a incubação de 14 h a 4°C. Em seguida, o bloqueio contra reações inespecíficas, sendo adicionados, por poço, 120 µL de solução PBS-Tween 0,05% acrescida de 2% caseína. O bloqueio ocorreu por 1 h a 37°C. Como anticorpo primário, foram utilizados os sobrenadantes de cultivo dos hibridomas ou o anticorpo purificado (dependendo do experimento). A seguir, foi acrescido o anticorpo secundário conjugado (Anti-IgG murino conjugado a peroxidase - Sigma) a uma diluição de 1:5.000. Ambos foram diluídos no mesmo tampão utilizado para o bloqueio das placas, sendo a incubação de 1 h a 37°C. Como controles da reação foram utilizados soro de camundongos pré-*imunes*, como controle negativo, e anticorpo anti-histidina produzido em camundongos, como controle positivo, como também, soro do camundongo imunizado (animal 3).

A revelação ocorreu com a adição de 100 µL de solução substrato- cromógeno orto-fenileno-diamina (OPD) (0,4% em solução tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,0, H₂O₂ 0,3%) por poço. Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ 2,5 N. Por fim, procedeu-se a leitura da densidade óptica a 492 nm em leitor de microplacas.

4.3 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS OU WESTERN BLOT (WB)

As amostras a serem analisadas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 12% utilizando o método descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado um sistema de transferência semi-seco (Pharmacia). A transferência utilizou a placa do ânodo coberta com 4 camadas de papel filtro contendo o tampão de transferência (25 mM Tris HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0,037% SDS) seguido da membrana de PVDF (Hybond ECL- GE Healthcare ativada com metanol). O gel foi colocado sobre a membrana evitando-se bolhas de ar no sistema. Outras quatro camadas de papel filtro previamente imersas em tampão de transferência foram colocadas sobre o gel. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 100 mA, em 25 V por 1 hora. A transferência foi avaliada utilizando um marcador de proteínas pré-corado (Thermo Scientific) na membrana.

Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBS (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L) por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS duas vezes e uma vez com TBST (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L). E depois, incubada com o anticorpo primário da reação em solução de leite 5% TBS, sendo mantida sob agitação durante 18 horas a 4°C. O anticorpo primário foi retirado através de duas lavagens sucessivas com TBS e uma com TBST. O anticorpo secundário foi o Anti-mouse IgG HRP (Sigma) de concentração 1 mg/mL diluído 1:4.000 vezes. Depois de quatro lavagens com TBS e uma com TBST, a membrana contendo a reação antígeno-anticorpo foi revelada com Kit ECL Plus Western Blotting Detection GE utilizando filme de Raio-X seguido de revelação com tampões revelador e fixador.

4.4 CULTIVO DAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

As linhagens tumorais de mama HB4aC3.6, HB4aC5.2, MDA-MB-436, MDA-MB-435, SKBR3, PMC42, MCF7, MDA-MB-231 e a linhagem epitelial normal HB4a foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco) 10%, 2 mM de glutamina e garamicina 40 µg/mL, seguindo o protocolo sugerido pela ATCC®.

4.5 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *ADAM33* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

As linhagens tumorais foram cultivadas e o RNA total foi isolado de um número aproximado de $2 - 4 \times 10^6$ células utilizando TRIzol Reagent (Life Technologies). Seguindo as especificações do fabricante foi realizada a síntese do cDNA utilizando aproximadamente 1000 ng de RNA total e a enzima High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) em uma reação com volume final de 20 μ L. Primeiro o RNA molde foi incubado com o OligodT a 65°C por 5 minutos e em seguida foi feita a síntese a 42°C por 60 minutos, seguido de 72°C por 15 minutos. Para a reação de RT-PCR foram utilizados 1 μ L de cDNA, tampão 1X, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 1U Taq Platinum (Invitrogen) e 8 pmoles dos iniciadores específicos universal 5' 'ACG GCT ACC TGG TAC CAC C e reverso 5' GCA GGA AGG CAT TGT GGT TT, em um volume final de 20 μ L. Os produtos das reações de RT-PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 μ g/ml (Sambrook & Russel, 2001).

4.6 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33

Para a seleção de anticorpos capazes de reconhecer apenas a proteína ADAM33 a especificidade dos anticorpos monoclonais foi testada. Para isso, foram testados 10 anticorpos monoclonais diferentes por WB a partir do extrato de proteínas da linhagem epitelial de mama HB4a, linhagem que expressa o gene *ADAM33*. Foram escolhidas, também, como controle positivo PMC42 e MCF7 que expressam o gene *ADAM33* e como controle negativo a linhagem MDA-MB-231 que não expressa *ADAM33*. O sobrenadante de 10 cultivos de hibridomas foram utilizados como anticorpo primário da reação. Para isso aproximadamente 100 μ g de proteínas totais de cada linhagem foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE. Para obtenção dos extratos das linhagens, estas foram crescidas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino até 4×10^6 células. As placas de cultivo foram lavadas com PBS 1X gelado, em seguida, foi adicionado 100 μ L PBS 1X gelado contendo 1 μ L de inibidor de protease (Kit Halt Thermo Scientific) e 1 μ L de EDTA 0,5 M. Em seguida, as células foram raspadas das placas com auxílio de *scrape* e transferidas para tubo tipo

eppendorf. As células foram centrifugadas a 900 x g 10 min a 4°C, o meio foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de tampão de lise (SDS 1%, Tris 50 mM), contendo 3 µL de inibidor de protease (Kit Halt Thermo Scientific) e 3 µL de EDTA 0,5 M. Em seguida, as células foram sonicadas em 6 ciclos de 20 segundos, com intervalos de 30 segundos e sempre em banho de gelo. Esses extratos foram submetidos à eletroforese desnaturante e WB como já descrito no item 4.3.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33

4.7.1 Avaliação da diluição do Anticorpo monoclonal purificado

As técnicas de ELISA e WB foram utilizadas para avaliar o desempenho do anticorpo monoclonal diluído. A proteína ADAM33 recombinante (ADAM33-Rec) (10 ug/ml) foi imobilizada em placas de 96 poços (Immuno Nunc, Thermo Fisher Scientific) para o ensaio de ELISA, e feitas diluições do anticorpo monoclonal purificado anti-ADAM33 (0,14 ug / mL). A análise por WB foi realizada com a proteína ADAM33-Rec (10 ug/mL) por SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF. O anticorpo primário, o anticorpo monoclonal purificado anti-ADAM33, foi diluído a partir de 0,14 ug / mL.

4.7.2 Isotipagem do anticorpo monoclonal selecionado

Para determinar o isotipo do anticorpo selecionado foi utilizado o Kit IsoStrip (Roche) conforme orientações do fabricante.

4.7.3 Sequenciamento das regiões hipervariáveis de Cadeia Leve (VL) e Cadeia Pesada (VH) de imunoglobulinas (IgG) do hibridoma secretor

O hibridoma selecionado foi cultivado e o RNA total foi isolado de um número aproximado de 4×10^6 células utilizando TRIzol Reagent (Life Technologies) e realizada a síntese do cDNA como descrito no item 4.5.

Para a reação de RT-PCR foram utilizados 2 µL de cDNA, tampão 1X, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 1U Taq Gold (Promega) e 8 pmoles de iniciadores específicos

em um volume final de 50 μ L. Os iniciadores específicos estão descritos no Quadro 1, e seguiram o protocolo de Fields *et al* (2013).

QUADRO 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA AS REAÇÕES DE PCR E SEQUENCIAMENTO DO HIBRIDOMA SECRETOR DE IgG

Nome	Sequencia (5' - 3')
Para a amplificação da VH de IgG	
VhRevU	GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG
VhForU	GAC AGT GGA TAR ACM GAT GG
Para a amplificação da Vk	
VkRev1	GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG
VkRev2	GAT ATT GTG ATG ACG CAG GCT
VkRev3	GAT ATT GTG ATA ACC CAG
VkRev4	GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT
VkRev5	GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT
VkRev6	GAT ATT GTG CTA ACT CAG TCT
VkRev7	GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT
VkRev9	CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT
VkForU	GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC

FONTE: Adaptado de Fields *et al* (2013).

Os oligonucleotídeos degenerados apresentam essas modificações: M (= A ou C), W (= A ou T), S (= C ou G), R (= A ou G).

Os produtos das reações de RT-PCR foram visualizados por eletroforeses em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 μ g/ml (Sambrook & Russel, 2001). Os fragmentos foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o protocolo Quick Gel Extration Kit Protocols (Qiagen). Os produtos purificados foram clonados no vetor pGEMTeasy (Promega) e eletroporados em estirpe de *Escherichia coli* DH10B. Os clones recombinantes foram selecionados por α -complementação e submetidos à reação de PCR de colônia para a confirmação da presença do inserto. Pelo menos 5 clones positivos na PCR de colônia foram submetidos à extração de DNA plasmidial utilizando o kit QiaPrep (Qiagen). Em torno de 300 a 500 ng de cada preparação foram sequenciados utilizando-se Big Dye terminator e o sequenciador XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

O resultado do sequenciamento foi analisado no IMGT/V-QUEST (BROCHET; LEFRANC, 2008), sistema que analisa a sequência de aminoácidos de imunoglobulinas (IG), identificando as sequências gênicas variáveis e hipervariáveis através de alinhamento com o banco de dados. Fornecendo, ainda, a estrutura final das imunoglobulinas, identificando as regiões de estrutura (FR) e *loops* hipervariáveis (ou CDRs) H1, H2, H3 (CDRs da cadeia pesada), L1 L2 e L3 (CDRs de cadeia leve), que são responsáveis pela interação com o antígeno alvo.

4.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

4.8.1 Imunocitoquímica das Linhagens Tumorais de Mama

O ensaio de imunocitoquímica (ICQ) das linhagens tumorais de mama utilizou células depositadas nas lâminas pela técnica de Cytospin. As células foram cultivadas, como descrito anteriormente, ressuspensas em PBS 1X contendo EDTA 0,5 mM e em seguida, utilizando uma suspensão de $2,5 \times 10^5$ células, foram centrifugadas à 800 x g por 5 minutos. Essas lâminas foram fixadas em álcool 70%. Então, as lâminas foram lavadas com água destilada. O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal anti-ADAM33 purificado. As lâminas foram incubadas em câmara úmida na geladeira por toda a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e depois incubadas por 15 minutos com tampão TBS pH 7,3. A seguir, foi utilizado o anticorpo secundário Advance link (Dako®) por 30 minutos seguido do reagente Advance enzyme (Dako), por 30 minutos. O cromógeno utilizado foi o DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Foram realizadas as lavagens em água por 5 minutos, 3 vezes com etanol absoluto por 1 minuto e a diafanização com 3 lavagens com xilol por 5 minutos. Por último, foi adicionada a lamínula para proteção dos cortes.

4.8.2 Imunohistoquímica das Amostras de Tumores de mama

As amostras tumorais de mama selecionadas foram dispostas utilizando-se a técnica de TMA seguindo o protocolo desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental – PUCPR (SCHULER *et al*, 2008).

As reações de imunohistoquímica (IHQ) foram realizadas nas secções dos tumores provenientes do bloco de TMA. As lâminas contendo os tumores foram desparafinizadas através de 2 lavagens em xilol por 10 minutos, 3 lavagens com etanol absoluto por 1 minuto e 1 vez com álcool etílico 80% por 1 minuto. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com o Kit Advance (Dako), que apresenta solução de peróxido de hidrogênio 5% em metanol. Após retirar o excesso dos reagentes, foi realizada a recuperação antigênica no Imuno Retrival (Dako) em banho maria à 99°C por 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso dos reagentes. O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal anti-ADAM33 purificado. As lâminas foram incubadas em câmara úmida na geladeira por toda a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e depois incubadas por 15 minutos com tampão TBS pH 7,3. A seguir foi utilizado o anticorpo secundário como descrito no item anterior.

Os cortes foram analisados pela patologista Dra. Ana Paula Martins Sebastião Patologista do Hospital Nossa Senhora das Graças.

Como controles da reação de IHQ foram utilizados tecido tumoral de mama na ausência de anticorpo primário, sendo o controle negativo da reação, e tecido pulmonar como controle positivo da reação.

4.9 DETERMINAÇÃO DO ESCORE DE ADAM33 NAS AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA

Para avaliar o desempenho do anticorpo monoclonal anti-ADAM33 testamos sua reatividade em amostras de câncer de mama. Para isso, utilizamos 44 amostras tumorais de mama, de um estudo anterior do nosso grupo, que demonstrou por PCR metilação específica (MSP) o perfil de metilação do gene *ADAM33* desses tumores (SENISKI et al., 2009).

As amostras foram classificadas quanto à expressão da proteína ADAM33. Os carcinomas tiveram os escores baseados no número de células positivas para a proteína ADAM33 visualizadas na IHQ. O valor do *cutt-off* para a ADAM33 foi em torno de 10% de células positivas.

Uma pontuação final variando de 0 a 4 foi atribuída para a avaliação da IHQ. Esta pontuação foi o resultado da análise de dois coeficientes, que somados,

demonstravam o escore final. O primeiro correspondeu a uma pontuação de intensidade que representou a intensidade média de células tumorais positivas (0, negativa; 1, fraco, 2, forte). Em seguida, uma pontuação de extensão foi atribuída, como segue: (0, negativa; 1 < 10%, 2 > 10%).

QUADRO 2 - DETERMINAÇÃO DO ESCORE DE ADAM33 NOS TUMORES DE MAMA POR IHQ

Padrão de Intensidade	Escore da Intensidade	Extensão	Escore da Distribuição
Negativo	0	Negativo	0
Positivo Fraco	1	Focal	1
Positivo Forte	2	Difuso	2

4.10 CORRELAÇÃO ENTRE O ESCORE DE ADAM33 NOS TUMORES DE MAMA E OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES

Os materiais tumorais empregados foram provenientes de amostras emblocadas em parafina do banco de tumores de pacientes do Hospital Nossa Senhora das Graças de Curitiba-PR. Foram selecionadas amostras de carcinomas ductais e lobulares guardados no período de 2002 a 2014. Os critérios de inclusão das amostras foram amostras de carcinoma do tipo lobular e ductal. O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUC (Processo número 0003469-2009; Registro CONEP: 5365; Protocolo CONEP: 0480.084.000-09).

Para cada um dos casos foram obtidos os dados clínico-patológicos referentes às pacientes através da análise dos laudos das biópsias dos tumores primários e dos prontuários do Hospital Nossa Senhora das Graças.

Os dados clínicos considerados foram: idade, tamanho do tumor, classificação do grau histológico tumoral conforme SBR (ScarffBloom-Richardson), comprometimento linfonodal, presença dos marcadores moleculares RE (receptor de estrógeno), RP (receptor de progesterona) e HER2 (Receptor 2 de fator de crescimento epidermal humano), EGFR (Receptor de fator de crescimento epidermal),

CK5/6 (citoqueratina 5/6), CK14 (citoqueratina 14), CK17 (citoqueratina 17), c-Kit, Ki-67, presença de metástase no momento e no seguimento terapêutico da paciente, o aparecimento de recidivas, óbito, tipo histológico e subtipo molecular.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de expressão da proteína ADAM33, a partir da análise de IHQ, e obtenção dos escores, foram correlacionados com os dados clínico-patológicos disponíveis para cada amostra de tumor.

A relação entre os dados clínico-patológicos obtidos das amostras de tumores e o escore da ADAM33 foram submetidas a diferentes análises estatísticas. Foram incluídos alguns dados, do trabalho publicado (SENISKI et al., 2009), referente aos resultados de MSP (Methylation-specific PCR). A relação estatística entre os escores de ADAM33 foram avaliadas através do teste qui-quadrado (χ^2) e/ou teste exato de Fischer.

Para a análise de sobrevida global, o tempo foi calculado a partir da data do diagnóstico da doença até o óbito enquanto que, para o cálculo da sobrevida livre de doença, foi considerado o tempo de diagnóstico até a ocorrência de metástases. Utilizando estas relações, foi aplicado o teste estatístico de Kaplan-Meier e as diferenças na mesma amostra analisadas pelo teste *log rank*. A análise de regressão para o risco proporcional de COX também foi utilizada para estimar risco relativo (HR) e intervalo de confiança (95% CI) para sobrevida global e sobrevida livre de metástases para as amostras que se mostraram diferenciais entre as variáveis de modo multifatorial e unifatorial. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa computacional SPSS (versão 16.0 SPSS Chicago, Illinois, USA) e estabelecido um erro de 5%, ou seja, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS

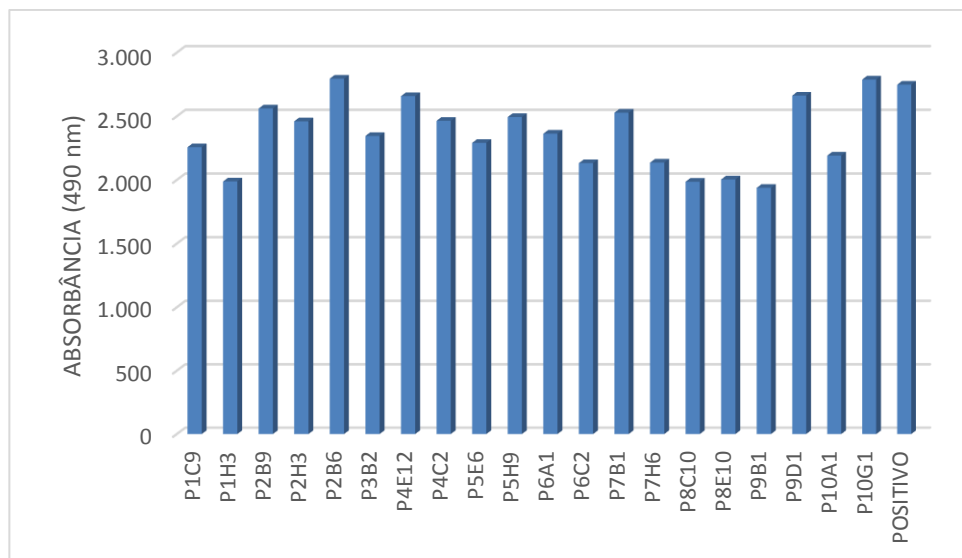
O processo de produção de anticorpos monoclonais utilizou os camundongos Balb/c previamente imunizados com a proteína ADAM33-Rec (MANICA et al, 2013). Para isso, o baço de dois dos animais que tiveram o maior título de anticorpos policlonais foram fusionados às células mielóides para a obtenção dos hibridomas.

Após o sacrifício dos animais, o baço foi retirado cirurgicamente e triturado. Os esplenócitos foram misturados à células de mieloma na proporção 5:1. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio de cultivo e distribuídas em placas de 96 poços na razão de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células por poço. Assim, as células fusionadas foram distribuídas em 10 placas, totalizando 960 poços para formação e crescimento dos hibridomas.

Obtidos os hibridomas, após o tempo de seleção, foi realizada a varredura para se determinar quais colônias secretavam anticorpos reativos à ADAM33-Rec. Para isso, empregou-se a técnica de ELISA, com a qual foram testadas 184 colônias, utilizando como controle positivo da reação o soro policlonal do animal 3.

O resultado do ELISA demonstrou que 165 colônias, das 184 testadas, produziam anticorpos que reconheciam a proteína ADAM33-Rec. Das 165 colônias positivas, foram selecionadas 20 (FIGURA 4) com os melhores resultados no ELISA.

FIGURA 4 - VARREDURA DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS ANTI-ADAM33 POR ELISA



FONTE: O autor (2016).

Resultado da absorbância (490 nm) da reação de ELISA para os 20 clones selecionados e o controle positivo.

Estas 20 colônias foram então submetidas à diluição limitante, sendo assim, cada colônia originou uma placa de 96 poços, que foi observada ao microscópio óptico invertido, e, após 14 dias, foram selecionados novos clones isolados. Esses foram testados por ELISA, novamente, e, então, 10 novos clones isolados foram escolhidos, sendo um de cada placa.

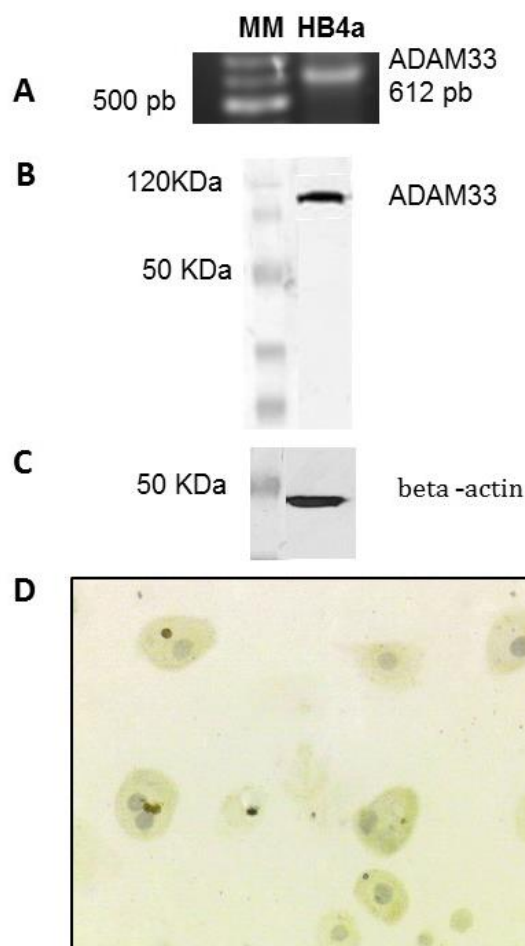
Esses 10 clones foram submetidos a uma nova diluição limitante, para garantir que esses fossem clones monoclonais. Então, após à terceira diluição, 10 clones isolados foram selecionados após serem testados por ELISA.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33

Os dez anticorpos monoclonais (mAbs) que apresentaram os melhores resultados no ensaio de ELISA foram testados pelos ensaios de Western Blot (WB) para que fossem escolhidos os hibridomas para os ensaios posteriores. Para isso, foi utilizado como controle positivo uma linhagem imortalizada normal de epitélio ductal de mama denominada HB4a (HARRIS et al., 1995) que expressa o gene *ADAM33* (FIGURA 5A). No resultado de WB, apenas um dos mAb mostrou uma única banda de aproximadamente 100 kDa que corresponde ao tamanho da proteína ADAM33

(FIGURA 5B), e foi capaz de reconhecer a proteína ADAM33 em sua conformação celular por ICC. Esse hibridoma passou a ser denominado GMGK06, e passou a ser o mAb utilizado nos experimentos seguintes.

FIGURA 5 - EXPRESSÃO DE ADAM33 EM LINHAGEM NORMAL DE MAMA



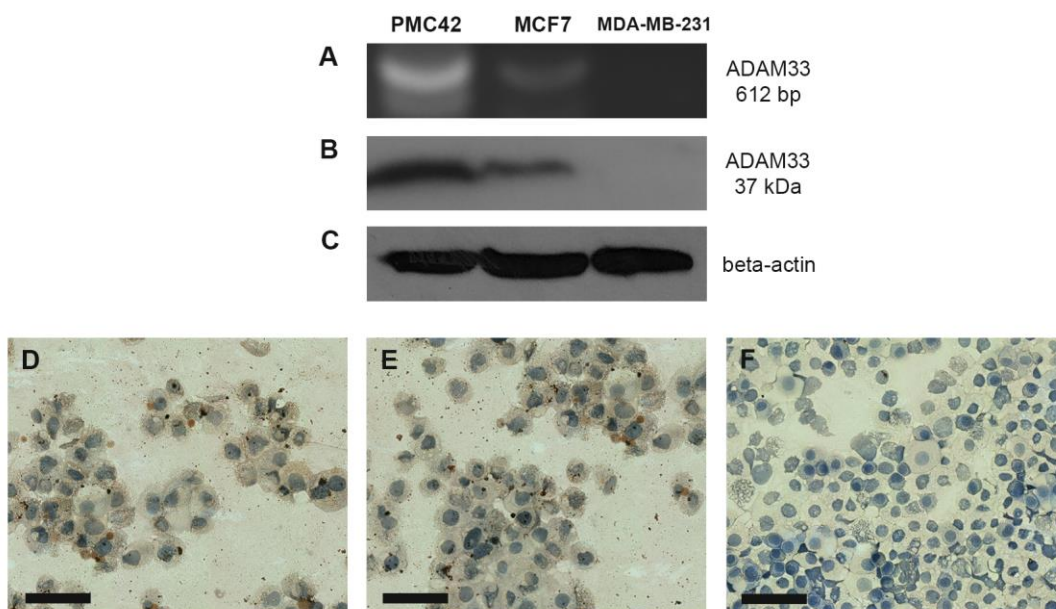
FONTE: O autor (2016).

Expressão de ADAM33 na linhagem humana normal epitelial de mama (HB4a): (A) RT-PCR: (MM) marcador de massa, HB4a mostrando a amplificação de um fragmento de 612 pb. (B) WB utilizando o anticorpo anti-ADAM33: mostrando um sinal positivo na linhagem, com aproximadamente 100kDa, e (C) a Beta-actina foi utilizada como o controle positivo para a reação de WB. (D) Reação de ICQ, mostrando reatividade para a proteína ADAM33.

A partir deste resultado foram utilizadas linhagens tumorais de câncer de mama que são positivas (PMC42 e MCF7) e negativa (MDA-MB-231) para a proteína ADAM33, de acordo com a amplificação do gene *ADAM33* por RT-PCR (FIGURA 6A). O resultado de WB (FIGURA 6B) mostra a imunorreatividade para as linhagens PMC42 e MCF7, e nenhum sinal detectado na linhagem MDA-MB-231. O tamanho da

banda observada nas linhagens ADAM33 positiva é de aproximadamente 37 kDa, já descrita, anteriormente, como uma variável transcricional (POWELL *et al.*, 2004). O ensaio de ICQ (FIGURA 6D, 6E, 6F) mostrou positividade, também *in situ* para as linhagens que expressam ADAM33 (PMC42 e MCF7). Assim, o hibridoma selecionado secreta anticorpos monoclonais que apresentam boa especificidade, pois, estas linhagens expressam outras proteínas da família ADAM como as ADAM 9, 12, 15, 17 e 23 (IBA *et al.*, 1999; O'SHEA *et al.*, 2003; ZHENG *et al.*, 2009; VERBISCK *et al.*, 2009). Ainda, o fato de não ter sido detectado sinal na linhagem negativa (MDA-MB-231) reforça a especificidade e a ausência de reação cruzada para outras proteínas desta família.

FIGURA 6 – EXPRESSÃO DE ADAM33 EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: (A) RT-PCR das linhagens tumorais de câncer de mama: PMC42 e MCF7 mostram a amplificação de um fragmento de 612 pb enquanto a amplificação não é observada na linhagem MDA-MB-231. (B) WB das linhagens tumorais de câncer de mama utilizando o anticorpo anti-ADAM33: mostrando um sinal positivo nas linhagens PMC42 e MCF7 e ausência de sinal na linhagem MDA-MB-231. (C) Beta-actina foi utilizada como o controle positivo para reação. Imunocitoquímica das linhagens tumorais de câncer de mama utilizando o anticorpo anti-ADAM33: apresentando reação positiva para as linhagens (D) PMC42 e (E) MCF7 e reação negativa (F) MDA-MB-231.

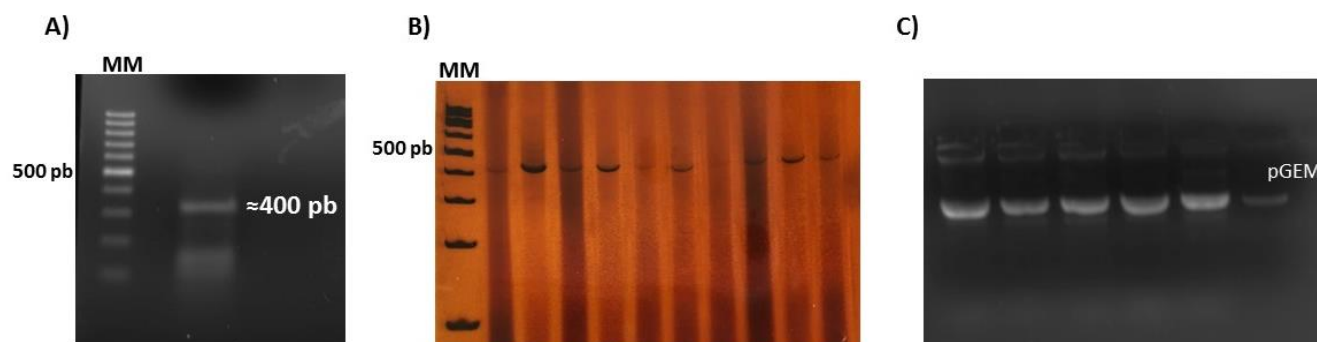
5.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL

Após a seleção do hibridoma, esse foi cultivado em meio livre de imunoglobulinas e o sobrenadante foi testado por ELISA, confirmando a presença dos anticorpos anti-ADAM33 que foram, então, purificados. O produto da purificação rendeu três frações de anticorpos com 0,28 g/L de proteína.

A isotipagem revelou que GMGK06 contém cadeias leves *kappa* (V- κ), combinada com uma cadeia pesada de IgG1. Esse resultado reforça que o anticorpo purificado é monoclonal.

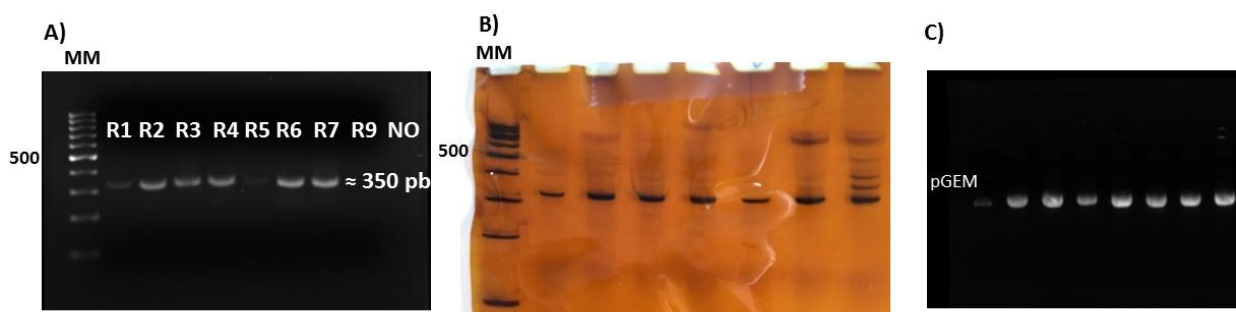
Seguindo o protocolo de Fields et al (2013) e utilizando os iniciadores específicos foi possível amplificar as regiões hipervariáveis de cadeia pesada (VH) (FIGURA 7A) e cadeia leve (VL) (FIGURA 8A) a partir de cDNA do hibridoma secretor. Assim, após a transformação das *E. coli*, selecionamos 5 clones (FIGURA 7B), para que, após a extração do DNA plasmidial (FIGURA 7C), estas regiões fossem sequenciadas. Procedimento similar pode ser visto na Figura 8 para a cadeia leve.

FIGURA 7. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA A CADEIA PESADA DA IgG DO HIBRIDOMA



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: A) Produto de amplificação utilizando os iniciadores de Cadeia Pesada (VH). B) PCR de Colônias. C) DNA plasmidial purificado.

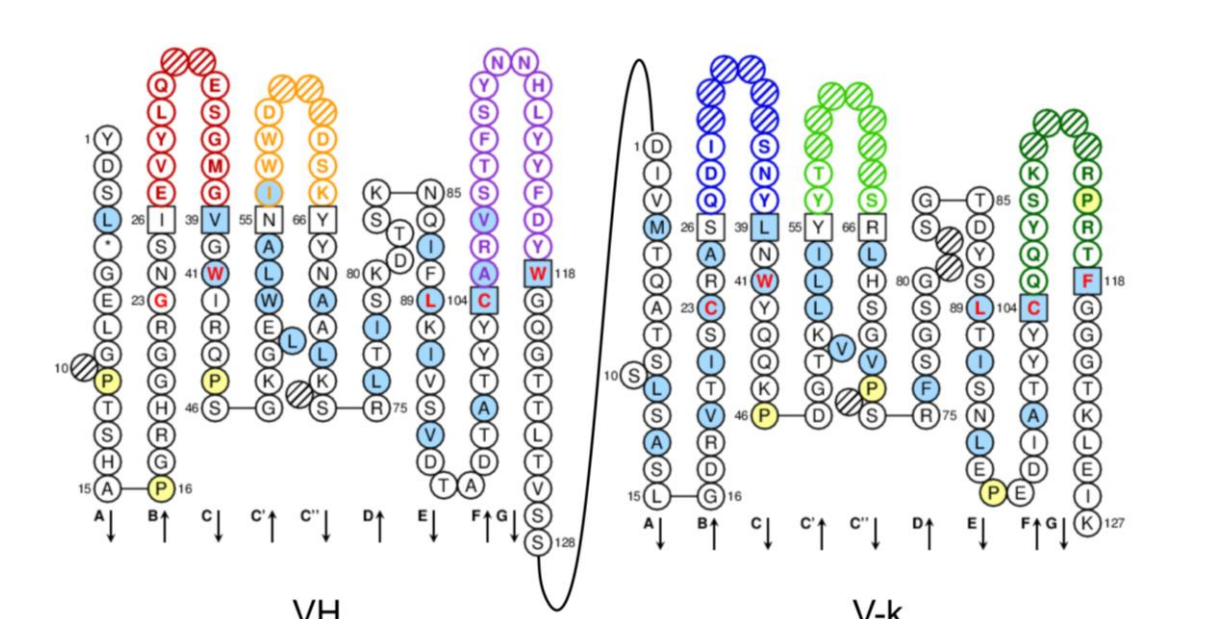
FIGURA 8. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA A CADEIA LEVE (V_k) DA IgG DO HIBRIDOMA

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: A) Produto de amplificação utilizando os iniciadores de Cadeia Leve (VL). B) PCR de Colônias. C) DNA plasmidial purificado.

Uma análise FASTA da sequência da proteína revelou forte homologia entre as sequências VH e V- κ do anticorpo e IgG1 de *Mus musculus*. De acordo com o banco de dados Sistema Internacional de Informação Imunogenética (IMGT), as sequências gênicas das cadeias pesada variável funcional (VH) e leve variável (VL) identificaram as regiões de estrutura (FR), que são regiões que apresentam aminoácidos conservados e *loops* hipervariáveis (ou CDRs) H1, H2, H3 (cadeia pesada), e L1 L2 e L3 (cadeia leve), que são responsáveis pela interação com o antígeno alvo (FIGURA 9), sendo as regiões específicas de cada anticorpo.

FIGURA 9 – COLAR DE PÉROLAS DAS SEQUÊNCIAS DOS DOMÍNIOS VARIÁVEIS DO GMGK06



FONTE: O autor (2016).

Colar de pérolas com a sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada (VH) e cadeia leve (V-k) do hibridoma GMGK06 obtido pelo IMGT. Pode-se identificar as regiões de FR (FR1: posição 1-26, FR2: 39-55, FR3: 66-104 e FR4: 118-128) e as regiões CDRs (CDR1: 27-38, CDR2: 56-65, CDR3: 105-117) responsáveis pela especificidade de ligação ao antígeno representados pelos aminoácidos coloridos. Os comprimentos dos CDRs são constantes, os *gaps* estão representados por posições desocupadas. Os aminoácidos conservados estão destacados por letras vermelhas. Em azul os aminoácidos hidrofóbicos. A linha que une as duas cadeias, é uma representação de um *link* para que estruturas como scFv (*the single chain fragment variable*) possam ser originadas.

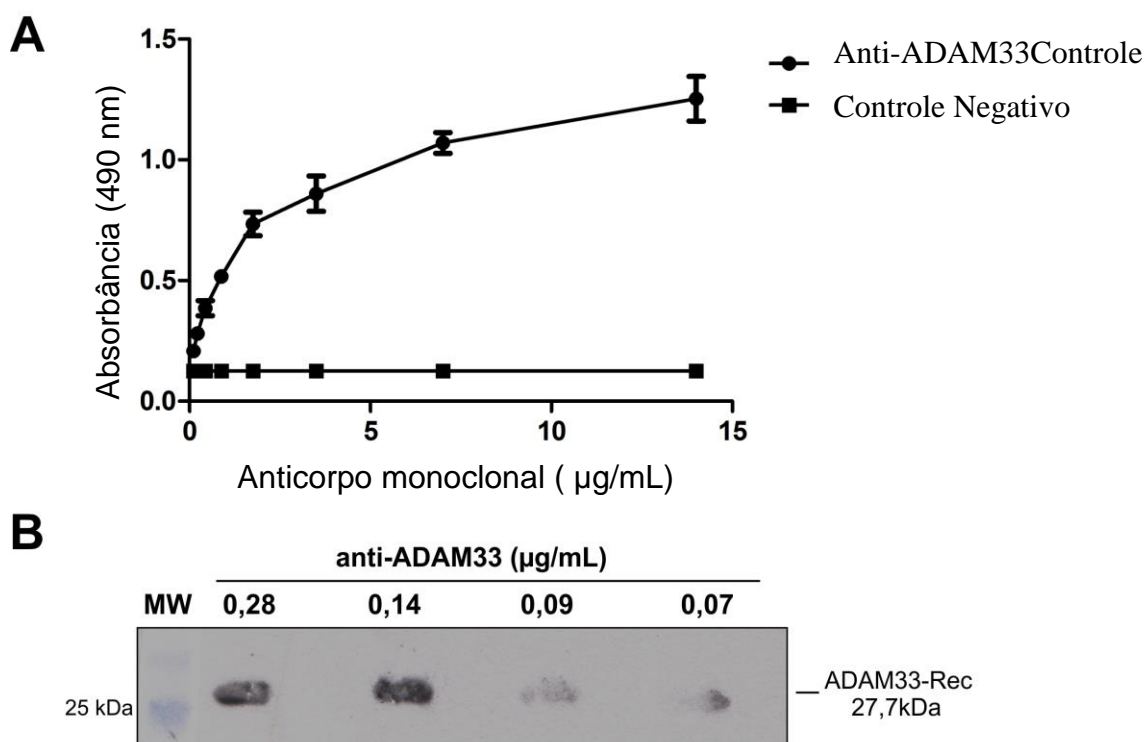
Essa análise que resultou no sequenciamento da região gênica do hibridoma, tornou possível a identificação das regiões hipervariáveis do mAb que são regiões exclusivas de cada anticorpo. Com esse resultado, foi possível solicitar o pedido de depósito de patente do hibridoma secretor do anticorpo junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), que está sob o registro de depósito BR1020150272839.

Além da solicitação da patente, a identificação dessas regiões, tornam possível a construção de moléculas recombinantes, técnica que está ganhando destaque nas rotinas de tratamento e pesquisa nos dias de hoje, pois, utiliza-se apenas das porções responsáveis pela interação com o antígeno, mantendo a afinidade e especificidade (FIELDS et al., 2013).

A reatividade de GMGK06 foi testada após a purificação, para avaliarmos se era mantida a capacidade de reconhecimento da proteína ADAM33-Rec. A reatividade

nos ensaios de ELISA e WB foi determinada como sendo 0,07 ng/mL e 0,21 ug/mL, respectivamente (FIGURA 10A e B).

FIGURA 10 – REATIVIDADE DO ANTICORPO PURIFICADO POR ELISA E WB



FONTE: O autor (2016).

A reatividade de GMGK06 foi testada após a purificação. (A) A diluição do anticorpo monoclonal e o seu desempenho nos ensaios de ELISA: ADAM33-Rec (10 ug/mL) foi imobilizada em placas, e o anticorpo monoclonal GMGK06 foi diluído a partir de 0,14 ug / ml. (B) o desempenho do anticorpo monoclonal no ensaio de WB com ADAM33-Rec (10 ug/mL), o anticorpo monoclonal GMGK06 foi diluído a partir de 0,14 ug/ml.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

As linhagens tumorais de mama são usadas amplamente como modelos para investigação das características do câncer mama (LACROIX & LECLERCQ, 2004; GILLET, VARMA, GOTTESMAN, 2013; GIT *et al.*, 2008). Elas apresentam replicação homogênea, não possuem interferência de células do estroma e são fáceis de serem cultivadas podendo assim, avaliar inúmeras características tumorais que antecedem às análises de tumores. Uma vez que se tratam de células provenientes do ambiente tumoral ou de metástase, mantêm a expressão de genes provenientes do seu

ambiente (LACROIX & LECLERCQ, 2004; GILLET, VARMA, GOTTESMAN, 2013; GIT *et al.*, 2008; KUANG *et al.*, 1998; NEVE *et al.*, 2006; KAO *et al.*, 2009).

Pensando nisso, e a partir do diferente perfil de expressão da proteína ADAM33 observados nas linhagens tumorais de mama por WB, buscou-se investigar um pouco mais sobre as características destes modelos celulares, quanto a expressão de marcadores que estão envolvidos no câncer de mama. Esses marcadores (QUADRO 3) correspondem aos que serão avaliados nos tumores, possibilitando uma análise comparativas entre os parâmetros do anticorpo anti-ADAM33 em ambos os modelos. Com base em diversos artigos, foi montado um quadro com as características das linhagens disponível a seguir (HARRIS *et al.*, 1995, 1999; KUANG *et al.*, 1998; LACROIX & LECLERCQ, 2004; NEVE *et al.*, 2006; GIT *et al.*, 2008; KAO *et al.*, 2009; GILLET; VARMA; GOTTESMAN, 2013).

QUADRO 3 - CARACTERÍSTICAS DAS LINHAGENS CELULARES.

Linhagens	IHQ ADAM33	Expressão do gene <i>ADAM33</i>	Marcadores Moleculares			Classificação	
			RE	RP	HER	Tipo histológico	Molecular Subtipo
HB4a	+++	pos+++	pos	pos	neg	Epitelial normal	Normal
HB4aC3.6	+++	pos+++	pos	pos	pos+	Epitelial normal + <i>c-erb</i> *	Her-2
HB4aC5.2	+++	pos+++	pos	pos	pos+++	Epitelial normal + <i>c-erb</i> **	Her-2
PMC42	++	pos++	pos	pos	neg	C (M)	Luminal A
MCF7	+	pos+	pos	pos	neg	AC/IDC (M)	Luminal B
MDA-MB-436	+ #	pos/neg	neg	neg	neg	AC/CDI (M)	Basal
MDA-MB-435	Neg	neg	neg	neg	neg	CDI	Basal
MDA-MB-231	Neg	neg	neg	neg	neg	AC/CDI (M)	Basal
SKBR3	+	Neg/pos	neg	neg	pos++	AC/CDI (M)	Her-2

* Uma cópia do gene *c-erb* (HARRIS et al., 1995)

** Cinco cópias do gene *c-erb* (HARRIS et al., 1999)

Expressão do gene *ADAM33* é variável na presença e ausência de soro fetal bovino

AC= Adenocarcinoma, C= carcinoma ductal, CDI= carcinoma ductal invasor, M= proveniente de metástase/derrame pleural

Após a análise de todos esses parâmetros reunidos no quadro, pode-se notar que a proteína ADAM33 está ausente nas linhagens que são classificadas como Basais, sendo linhagens que não expressam receptores para o estrógeno, progesterona e HER2, e ainda, expressam genes de células mioepiteliais.

A linhagem tumoral MDA-MB-436, por sua vez, apresentou uma baixa expressão de ADAM33, e após esse resultado foi melhor avaliada. Nos ensaios de MSP (SENISKI *et al.*; 2009) esta linhagem mostrava-se positiva para a condição metilada e não metilada, ou seja, havia uma população de células heterogêneas contendo células que apresentam o promotor do gene *ADAM33* metilado e populações de células sem metilação. Em 2012, Yang e colaboradores mostraram que em tecido pulmonar a expressão de ADAM33 é modulada pela ação de TGF- β . A partir disso, a linhagem MDA-MB-436 foi cultivada sem o soro fetal bovino, que contém inúmeros fatores de crescimento, incluindo o TGF- β (YANG *et al.*, 2012) e o resultado obtido foi a ausência de expressão da proteína ADAM33 por RT-PCR (resultado não

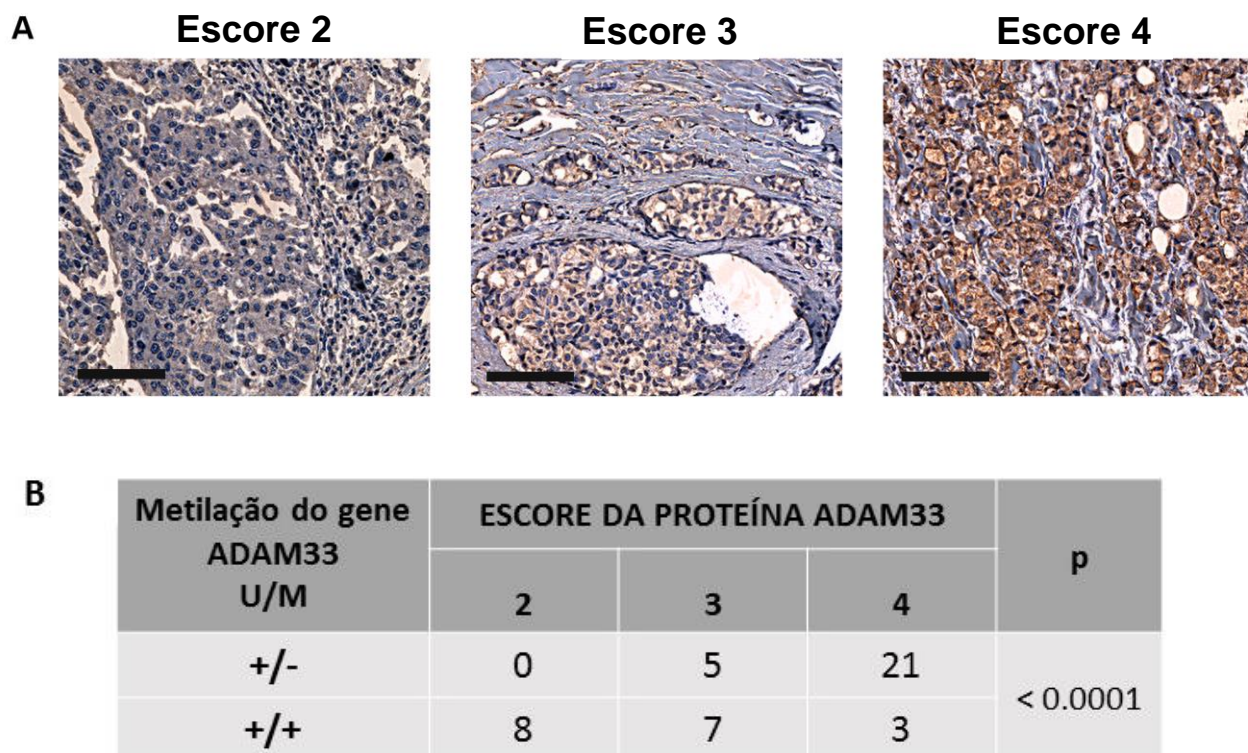
mostrado). Sendo assim, esta linhagem, considerada como Basal, também, não expressam ADAM33.

Nos modelos celulares disponíveis no laboratório não foi possível avaliar a presença ou ausência de ADAM33 em modelos celulares de carcinoma lobular invasivo (CLI), condição já observada nos tumores, uma vez que todas as linhagens são provenientes de tumores ductais invasivos.

5.5 DETERMINAÇÃO DO ESCORE DE ADAM33 NAS AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA

Para se estabelecer um sistema de escore de imunorreatividade da proteína ADAM33, foi realizado um ensaio de IHQ com 44 amostras de câncer de mama parafinados. Estas amostras já haviam sido utilizadas em um estudo anterior (SENISKI et al., 2009). De acordo com a intensidade e extensão da reação (FIGURA 11A) e utilizando os parâmetros do QUADRO 2, foram determinados três escores diferentes para proteína ADAM33 em amostras de câncer de mama. Estes por sua vez foram: escore 2 para fraca reatividade, escore 3 para intermediária reatividade e escore 4 para forte reatividade. A partir de resultados prévios sobre o perfil de metilação da região promotora do gene *ADAM33* nas mesmas amostras (promotor do gene metilado ou não-metilado) (SENISKI, 2009) foram relacionados o perfil de metilação e a expressão da proteína. Dentre estas 44 amostras, 21 apresentaram alta positividade para a proteína ADAM33 com o escore 4; possuindo também estas amostras, a região promotora do gene não metilado (FIGURA 11B). Adicionalmente, 15 amostras que apresentaram baixa expressão da proteína ADAM33 (escore 2 ou 3) também continham o promotor do gene *ADAM33* metilado ($p < 0,0001$). Em resumo, observou-se que as amostras com o promotor do gene *ADAM33* metilados tiveram baixa expressão da proteína ADAM33 e vice e versa, o que indica uma relação inversa entre a expressão da proteína e a metilação do promotor do gene tal como esperado.

FIGURA 11 - EXPRESSÃO DE ADAM33 EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE MAMA PARAFINADO



FONTE: O autor (2016).

(A) Escore da ADAM33: Escore 2, baixa expressão da proteína ADAM33; Escore 3, expressão intermediária da proteína ADAM33; Escore 4, alta expressão da proteína ADAM33. Os resultados são mostrados em aumento de X100. (B) Correlação entre a metilação do gene *ADAM33* e o Escore da proteína ADAM33. Promotor do gene promotor não-metilado (U); promotor do gene metilado (M).

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE O ESCORE DE ADAM33 NOS TUMORES DE MAMA E OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES

Após a confirmação da positividade e da especificidade do anticorpo monoclonal para ADAM33 no primeiro grupo de amostras clínicas (44 amostras), a expressão da proteína ADAM33 foi avaliada em um coorte diferente de pacientes. Para isso, analisamos o perfil da proteína ADAM33 em 212 amostras de câncer de mama organizadas em *tissue microarray* (TMA). A idade média das pacientes foi de $57 \pm 13,83$ anos (variação de 27 a 88 anos). Os tipos histológicos foram o carcinoma ductal invasor (CDI) ($n = 193$; 91%) e outros (carcinoma lobular invasor, micropapilar e tubular) ($n = 16$; 8,6%). O estatus dos linfonodos das pacientes foi positivo em 99 pacientes (46,7%) e negativo em 113 pacientes (53,3%). Outros dados clínico-

patológicos (condição menstrual, tamanho tumor, metástase e morte) encontram-se resumidos na Tabela 1.

A expressão de ADAM33 foi atribuída a um dos três escores, como descrito na seção anterior: escore 2 (fraco), escore 3 (intermediário) ou escore 4 (forte). O escore de ADAM33 não foi significativamente associada com a idade ($p = 0,679$), o tamanho do tumor ($p = 0,510$), grau histológico (SBR) ($p = 0,161$), condição menstrual ($p = 0,498$), estatus dos linfonodos ($p = 0,173$) e de expressão de CK14 ($p = 0,416$). Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão ADAM33 e metástases ($p = 0,049$), morte ($p = 0,024$), tipo histológico ($p = 0,034$) e subtipo molecular ($p < 0,001$). Além disso, a relação entre o escore da ADAM33 e a expressão dos marcadores do painel de IHQ foi significativa para: RE ($p < 0,001$), PR ($p < 0,001$), HER2 ($p = 0,045$), EGFR ($p = 0,042$), CK5/6 ($p = 0,046$), CK17 ($p = 0,040$), c-Kit ($p = 0,023$) e Ki-67 ($p = 0,032$) (Tabela 1).

TABELA 1 - DADOS CLÍNICOS PATOLÓGICOS EM RELAÇÃO AO ESCORE DA ADAM33.

Variáveis	N (%)	Escore da ADAM33			P value
		2	3	4	
Idade					
< 45	42 (19.8)	13 (31)	14 (33.3)	15 (35.7)	0.6719
≥ 45	170 (80.2)	44 (25.9)	53 (31.2)	73 (42.9)	
Tamanho do Tumor (cm)					
≤ 2	98 (46.2)	23 (23.5)	34 (34.7)	41 (41.8)	0.510
> 2	114 (53.8)	34 (29.8)	33 (28.9)	47 (41.2)	
SBR					
I	43 (20.3)	13 (30.2)	11 (25.6)	19 (44.2)	0.161
II	99 (46.7)	20 (20.4)	32 (32.6)	47 (48.0)	
III	70 (33.0)	24 (35.2)	24 (33.8)	22 (31.0)	
Condição Menstrual					
Pré-menopausal	98 (65.3)	25 (25.5)	27 (27.6)	46 (46.9)	0.4985
Pós-menopausal	52 (34.7)	18 (34.6)	13 (25.0)	21 (40.4)	
Comprometimento de Linfonodos					
Negativo	113 (53.3)	35 (31)	30 (26.5)	48 (42.5)	0.173
Positivo	99 (46.7)	22 (22.2)	37(37.4)	40 (40.4)	
RE					
Negativo	91 (42.9)	34 (37.4)	37 (40.6)	20 (22.0)	< 0.001
Positivo	121 (57.1)	23 (19.0)	30 (24.8)	68 (56.2)	
RP					
Negativo	94 (44.3)	36 (38.3)	36 (38.3)	22 (23.4)	< 0.001
Positivo	118 (55.7)	21 (17.8)	31 (26.3)	66 (55.9)	

HER2					
Negativo	126 (59.4)	41 (32.5)	40 (31.7)	45 (35.7)	0.045
Positivo	86 (40.6)	16 (18.6)	27 (31.4)	43 (50.0)	
EGFR					
Negativo	130 (86.1)	29 (22.3)	45 (34.6)	56 (43.1)	0.042
Positivo	21 (13.9)	10 (47.6)	6 (28.6)	5 (23.8)	
CK 5/6					
Negativo	118 (76.1)	25 (21.2)	41 (34.7)	52 (44.1)	0.046
Positivo	37 (23.9)	15 (40.6)	12 (32.4)	10 (27.0)	
CK 14					
Negativo	85 (57.4)	19 (22.4)	28 (32.9)	38 (44.7)	0.416
Positivo	63 (42.6)	19 (30.2)	22 (34.9)	22 (34.9)	
CK 17					
Negativo	104 (64.2)	20 (19.2)	38 (36.6)	46 (44.2)	0.040
Positivo	58 (35.8)	21 (36.2)	20 (34.5)	17 (29.3)	
c-Kit					
Negativo	105 (64.8)	22 (21.0)	33 (31.4)	50 (47.6)	0.023
Positivo	57 (35.2)	20 (35.1)	22 (38.6)	15 (26.4)	
Ki-67					
Baixo	98 (61.3)	21 (21.4)	28 (28.6)	49 (50.0)	0.032
Alto	62 (38.7)	19 (30.7)	25 (40.3)	18 (29.0)	
Metástase					
Negativo	128 (67.8)	30 (23.4)	31 (24.2)	67 (52.4)	0.049
Positivo	61 (32.2)	23 (37.7)	17 (27.9)	21 (34.4)	
Morte					
Negativo	137 (68.2)	28 (20.4)	35 (25.6)	74 (54.0)	0.020
Positivo	64 (31.8)	25 (39.1)	13 (20.3)	26 (40.6)	
Tipo Histológico					
Ductal	170 (91.4)	50 (29.4)	55 (32.4)	65 (38.2)	0.026
Outros*	16 (8.6)	10 (62.5)	4 (25.0)	2 (12.5)	
Subtipo Molecular					
Luminal A	47 (31.1)	4 (8.5)	12 (25.5)	31 (66)	< 0.001
Luminal B	41 (27.1)	6 (14.6)	13 (31.7)	22 (53.7)	
Her2	22 (14.6)	4 (18.2)	12 (54.5)	6 (27.3)	
Basal-Like	24 (15.9)	15 (62.5)	8 (33.3)	1 (4.2)	
TNG	17 (11.3)	10 (58.8)	6 (35.3)	1 (5.9)	

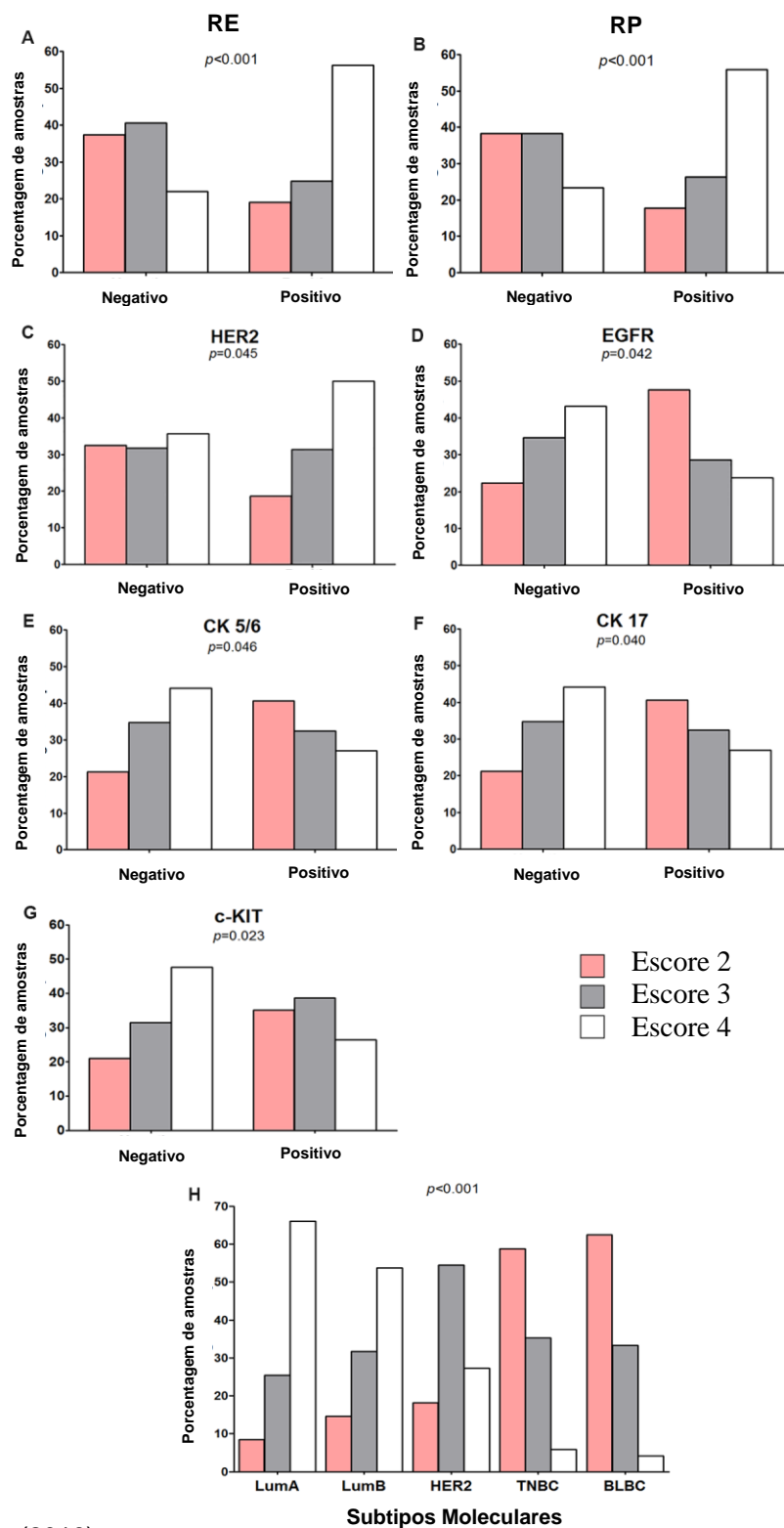
* Outros: Carcinoma lobular invasor, micropapilar e túbulo-lobular.

A relação entre a expressão da proteína ADAM33 e os marcadores de proteínas são melhor observados na FIGURA 12. Entre os tumores RE+ (positivo), aproximadamente 56% destes, apresentaram uma elevada expressão de ADAM33 (escore 4), enquanto que 78% das amostras que eram RE- (negativo) mostraram baixa expressão de ADAM33 (escore 2 ou 3) ($p < 0,001$). Uma relação semelhante foi

observada com o PR, onde aproximadamente 55% dos tumores RP+ expressam escore 4 da ADAM33, e 76% dos tumores RP- foram atribuídas ao escore 2 ou 3 ($p < 0,001$) da proteína ADAM33. A expressão de HER2 também foi relacionada negativamente com alta expressão de ADAM33, aproximadamente 50% dos tumores HER2 + tiveram escore 4 ($p = 0,045$). Quanto a expressão dos marcadores basais, EGFR, CK5/6 e CK17, observou-se que os tumores com EGFR +/ CK5/6 +/ CK17 + apresentaram principalmente o escore 2 de ADAM33 (47%, 40% e 36%, respectivamente), enquanto que os tumores com o EGFR -/ CK5/6 -/ CK17- apresentaram, em geral, escore 4 de ADAM33 (43%, 44% e 44%, respectivamente). O escore de ADAM33 foi elevado (4) em amostras de c-Kit negativo (47%), enquanto 73% das amostras com c-Kit positivo tinham escore 2 ou 3 ($p = 0,023$).

Com base nos marcadores moleculares utilizados neste estudo, as amostras de câncer de mama foram organizadas em 5 grupos, tal como sugerido por outros pesquisadores, como se segue (NIELSEN et al., 2004; CHEANG et al., 2008, 2015; PARKER et al., 2009; BLOWS et al., 2010; VIALE et al., 2014): **LumA** (RE+ / RP+ / HER2-); **LumB** (RE+ / RP+ / HER2+); **HER2** (RE- / RP- / HER2+), **BLBC** (RE- / RP- / HER2- / EGFR+ / CK5/6+) e **TNG** (RE-/ RP- / HER2-). A relação dos subtipos moleculares e o escore da proteína ADAM33 pode ser observado na FIGURA 12H. Os subtipos moleculares que são RE+/RP+ (LumA e LumB) apresentaram, em sua maioria, escore 4 de ADAM33, enquanto que os subtipos BLBC e TNG apresentaram baixa expressão de ADAM33 (escore 2) ($p < 0,001$).

FIGURA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE OS ESCORES DE ADAM33 E OS MARCADORES MOLECULARES

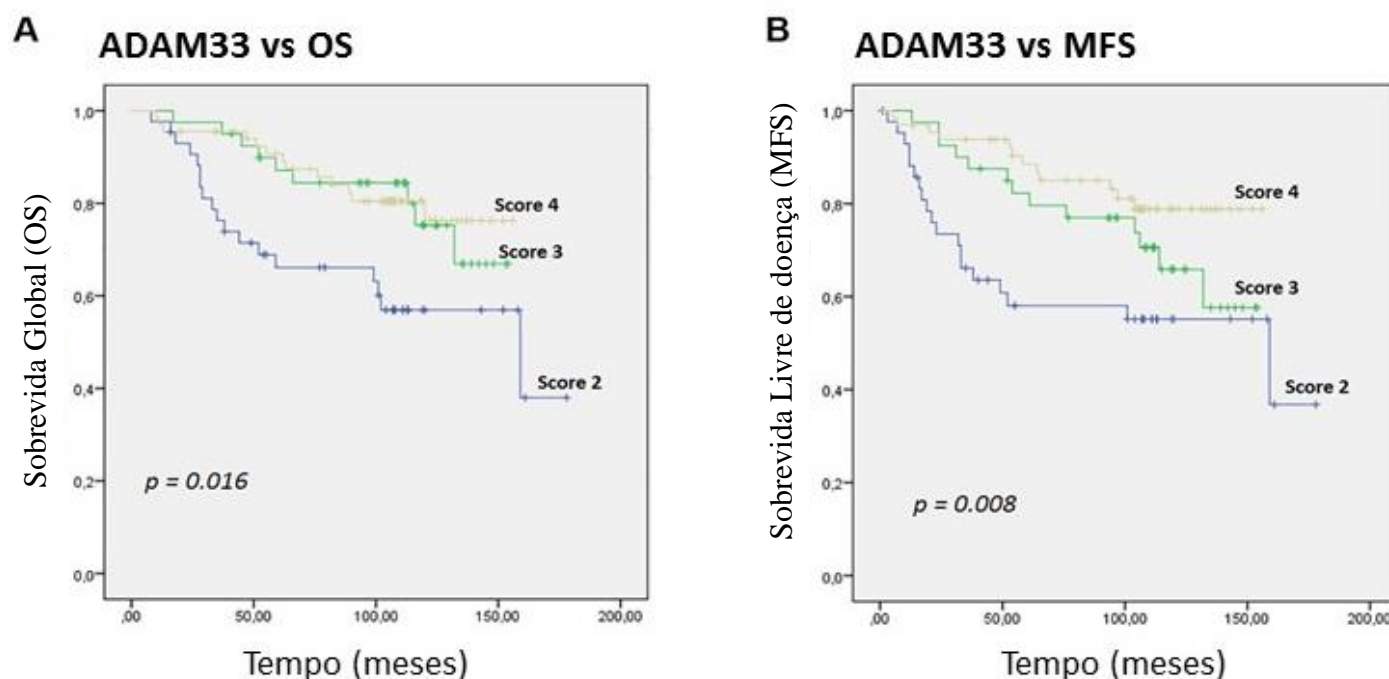


FONTE: O Autor (2016).

LEGENDA: Porcentagem de amostras que mostraram uma correlação entre o escore de ADAM33 e (A) RE ($p < 0,001$); (B) RP ($p < 0,001$); (C) HER2 ($p = 0,045$); (D) EGFR ($p = 0,042$); (E) CK 5/6 ($p = 0,046$); (F) CK17 ($p = 0,040$); (L) c-Kit ($p = 0,023$) e (H) subtipos moleculares ($p < 0,001$).

Estes resultados, juntamente com os parâmetros clínicos, sugerem que a proteína ADAM33 pode ser um importante fator prognóstico para pacientes com câncer de mama. Para testar esta hipótese, o valor prognóstico de todos os dados clínico-patológicos das 212 pacientes foi avaliado para a sobrevida global (OS) e sobrevida livre de metástases (MFS), utilizando o teste de Kaplan-Meier (valor p para o *log-rank* teste) (FIGURA 13).

FIGURA 13 - CURVA DE KAPLAN-MEIER PARA O TEMPO DE PROGRESSÃO DE ACORDO COM O ESCORE DE ADAM33



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: (A) Curva de Kaplan-Meier com a estimativa de sobrevida global e (B) sobrevida livre de doença em relação ao escore de ADAM33. O valor de p para o *log-rank* teste.

A sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (MFS) em relação ao escore da ADAM33 mostrou-se respectivamente $p = 0,016$ e $p = 0,008$ (FIGURA 13A e B). Ou seja, quanto menor a expressão de ADAM33, menor o tempo de OS e a MFS (escore 2). Assim como, quanto maior a presença de ADAM33 (escore 4), há maior OS e MSF das pacientes por esta análise univariada.

Na análise multivariada, ou pela regressão de Cox, as variáveis OS e MFS e seus valores obtidos são mostrados na Tabela 2. Nesta análise, foram selecionadas todas as variáveis que apresentaram $p < 0,05$ da análise univariada (Tabela 2). Para

a sobrevida global, os fatores de pior prognóstico foram: altos valores de SBR ($p = 0,010$), baixa expressão ADAM33 ($p = 0,013$) e a ocorrência de metástases ($p < 0,001$). Além disso, a expressão ADAM33, morte e subtipo molecular ($p = 0,021$, $p < 0,001$, $p = 0,020$, respectivamente) foram considerados fatores de prognósticos independentes para MFS. Pacientes com escores 2 de ADAM33 tem maior risco de morte (HR 0,464; IC 95% 0,253-0,848) e maior risco do desenvolvimento de metástase (HR 0,581; IC 95% 0,365 - 0,923).

TABELA 2. O TEMPO DE PROGRESSÃO DO CANCER DE MAMA EM RELAÇÃO ÀS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS: REGRESSÃO DE COX MODELO DE RISCOS PROPORCIONAIS

Análises	Sobrevida Global			Sobrevida livre de Metástase		
	HR	95 % CI	p value	HR	95 % CI	p value
Análise Univariada						
SBR	2.072	1.267 to 3.389	0.004			0.053
Tamanho Tumoral				1.909	1.010 to 3.608	0.047
ADAM33	0.618	0.423 to 0.904	0.013	0.576	0.400 to 0.829	0.003
RE	0.299	0.151 to 0.590	0.001	0.321	0.169 to 0.608	0.000
RP	0.259	0.129 to 0.521	0.000	0.281	0.147 to 0.540	0.000
Linfonodos	2.807	1.450 to 5.434	0.002	2.380	1.285 to 4.405	0.006
Metástases	12.638	5.982 to 26.70	0.000			
Morte				15.403	7.77 to 30.534	0.000
Subtipo molecular	1.428	1.102 to 1.851	0.007	1.463	1.145 to 1.869	0.002
Análise Multivariada						
SBR	3.075	1.304 to 7.248	0.010			
ADAM33	0.464	0.253 to 0.848	0.013	0.581	0.365 to 0.923	0.021
Metástases	20.862	7.877 to 55.256	0.000			
Morte				13.969	6.513 to 29.69	0.000
Subtipo molecular			0.072	0.512	0.291 to 0.900	0.020

6. DISCUSSÃO

As proteínas da família ADAM estão envolvidas em diversos processos fundamentais, tais como a adesão e migração celular, ancoragem de proteínas de membrana e proteólise. Por este motivo, não é surpreendente que a expressão desregulada de membros da família ADAM esteja envolvida em diversos tipos de câncer (MOCHIZUKI; OKADA, 2007; DUFFY et al., 2011; TOQUET et al., 2012; ZHENG et al., 2012; LI et al., 2013; MICOCCI et al., 2013; FELDINGER et al., 2014).

O gene *ADAM33* já foi alvo de estudos anteriores em nosso laboratório, onde foi observado que a hipermetilação na região promotora do gene *ADAM33* estava envolvida com o silenciamento do gene em linhagens tumorais de mama e em tumores de mama do tipo lobular (SENISKI et al., 2009). Diante dessas observações, buscamos avaliar a expressão da proteína ADAM33 e, assim, validar sua potencial utilização como um biomarcador no câncer de mama.

A avaliação clínica padrão no câncer de mama envolve a IHQ em cortes de tecidos parafinados. Embora existam anticorpos anti-ADAM33 comerciais, gerados a partir de peptídeos sintéticos, esses já foram questionados quanto a sua especificidade em alguns estudos (HAITCHI et al., 2005; LEE et al., 2006; FOLEY et al., 2007; YANG et al., 2008), inclusive na nossa experiência. A especificidade do anticorpo é essencial para avaliar a expressão de uma proteína e tornar possível a avaliação em IHQ.

Com intuito de se produzir anticorpos mais específicos para a ADAM33, foram produzidos anticorpos monoclonais a partir da proteína humana ADAM33-Rec. A seleção de mAb foi baseada na reatividade e especificidade do mAb para ADAM33 por ELISA e WB. A proteína ADAM33-Rec, utilizada no ELISA, selecionou os hibridomas com maior título de anticorpos. Utilizando uma linhagem epitelial humana normal (HB4a), foi selecionado um hibridoma, capaz de reconhecer a proteína ADAM33 humana. O mAb foi capaz de sinalizar de modo específico apenas para as linhagens tumorais de mama positivas para ADAM33, PMC42 e MCF7 (FIGURA 6), e, não reconheceu nenhum sinal na linhagem tumoral negativa MDA-MB-231.

Tendo em vista que o objetivo da utilização deste mAb era para ensaios de IHQ, precisávamos de um mAb que reconhecesse a proteína ADAM33 nas células. Por isso, testamos a reatividade do mAb em ensaio de ICQ. Pode-se observar que o mAb produzido foi capaz de reconhecer a proteína ADAM33 endógena, e ainda a sua

distribuição, nas células de linhagens tumorais de câncer de mama, PMC42 e MCF7, que são positivas para a expressão ADAM33 (positividade citoplasmática) (FIGURA 6D e E). Esta positividade foi semelhante ao que foi anteriormente observado em tecido pulmonar em que 10% da ADAM33 produzida é direcionada para a membrana citoplasmática no epitélio das vias aéreas (GARLISI et al., 2003). Não se observou qualquer sinal (FIGURA 6B e F) na linhagem tumoral de mama, MDA-MB-231, que é negativa para ADAM33.

Após analisar o perfil de expressão das linhagens tumorais de câncer de mama (QUADRO 3) quanto a expressão de ADAM33, podemos perceber que a proteína está presente em linhagens não invasivas de câncer de mama (HB4a, HB4a C3.6, HB4a C5.2, MCF7, PMC42) e ausente em linhagens invasivas (MDA-MB-436, MDA-MB-435 e MDA-MB-231). Esse perfil de expressão nos chamou a atenção, e nos fez pensar que a ausência da proteína ADAM33 pode estar envolvida nos mecanismos de invasão e metástases, pois, nesses processos ocorre a alteração das proteínas de adesão celular. Alguns trabalhos demonstram que o domínio desintegrina nas proteínas ADAM pode promover a adesão e a migração pela ligação com integrinas (SEALS; COURTNEIDGE, 2003; HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005; ZIGRINO et al., 2007). As integrinas e sindecans cooperam com a estimulação da ligação de células às proteínas da MEC, portanto, a habilidade das ADAMs em interagir com as integrinas, sindecans e as proteínas da MEC sugere que as mesmas poderiam ter papéis-chave na modulação de interações célula-célula e célula-matriz (WHITE, 2003; HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005).

Mierke et al (2011) e Taherin et al (2011) analisaram a expressão de integrinas em linhagens tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-435 e MCF-7) e encontraram nessas linhagens altos níveis de expressão das integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ (MIERKE et al., 2011; TAHERIAN et al., 2011). A linhagem tumoral de câncer de mama MDA-MB-231, que é altamente invasiva, em experimentos utilizando agentes anti- $\beta 1$ -integrina e anti- $\alpha 5$ -integrina, assim como células silenciadas para $\alpha 5$ -integrina (*knockdown*), apresentaram diminuição drástica da capacidade de invasão desta linhagem na matriz extracelular. Deste modo, estes autores afirmaram que a integrina $\alpha 5\beta 1$ poderia facilitar o processo tumorigênico no câncer de mama (TAHERIAN et al., 2011).

Huang et al mostraram que a proteína ADAM33 inibe a migração mediada por $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ integrinas em células CHOK1. O padrão de inibição ocorre através da

ligação da ADAM33 a partir do domínio desintegrina com a porção $\beta 1$ de integrinas de células adjacentes (HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005). Assim, é uma hipótese plausível que, em linhagens tumorais de mama invasivas, tais como a MDA-MB-231, o silenciamento epigenético de ADAM33 pode ser um importante processo para que aconteça a invasão. É importante destacar que ADAM33 não é a única proteína responsável pela facilitação ou a inibição de metástases. A metástase é um processo complexo, que envolve diversos mecanismos celulares importantes desde a invasão até o estabelecimento da colônia metastática no local secundário e depende de uma série de outras proteínas.

A variação na expressão do gene *ADAM33* nas amostras de câncer de mama através de técnicas de PCR específicos de metilação (MSP), foi descrito anteriormente (SENISKI et al., 2009). No presente estudo, foi possível comparar a expressão gênica de ADAM33 com a presença da proteína nas mesmas amostras, mostrando que os tumores que possuíam o promotor do gene *ADAM33* metilados exibiram um sinal fraco e/ou intermediário da proteína ADAM33 (escores 2 ou 3), enquanto as amostras em que o promotor do gene *ADAM33* não apresentou metilação possuíam alto escore de ADAM33 (escore 4). Foi possível confirmar a capacidade do mAb produzido em reconhecer a proteína ADAM33 em amostras tumorais, assim como estimar a variação da expressão dessa proteína.

Extensas pesquisas continuam buscando novos biomarcadores que possam melhorar o prognóstico do câncer de mama, e facilitar a implementação de novas terapias. O alto custo e a complexidade da análise do perfil de expressão gênica, tornaram-na impraticável como uma ferramenta de diagnóstico de rotina em hospitais. Além disso, a classificação dos subgrupos de câncer de mama com base nos marcadores IHQ tem se tornado amplamente utilizado, tanto em ambientes clínicos, como de pesquisas, devido à sua confiabilidade e reprodutibilidade (CHEANG et al., 2008; BLOWS et al., 2010; GLOYESKE et al., 2014; DAI et al., 2015). Nesse estudo, foram analisados os dados clínico-patológico e a expressão de um painel de marcadores de IHQ (RE, PR, HER2, EGFR, CK 5/6, CK14, CK17, c-Kit e Ki-67) e comparados com os escores da proteína ADAM33 para determinar sua importância como um marcador de prognóstico ou preditivo para o câncer de mama.

Os carcinomas de mama do tipo LumA e LumB são os que possuem melhor prognóstico, por possuírem alvo terapêutico, e são menos agressivos em comparação aos do tipo HER2, TNG e BLBC (NIELSEN et al., 2004; PETRELLI et al., 2009;

BLOWS et al., 2010). Foi possível observar que no escore 4 da ADAM33, ou elevados níveis de expressão da proteína, está diretamente relacionada com a RE +/- PR +, à baixa expressão Ki-67 e ausência da expressão de marcadores basais (EGFR, CK5 / 6 e c-Kit). Além disso, um sinal forte para ADAM33 mostrou-se relacionado com a ausência de metástases ($p = 0,049$) e morte ($p = 0,024$) das pacientes. Estes resultados sugerem que ADAM33 pode ser um importante marcador de bom prognóstico da doença, e também, que a proteína ADAM33 poderia atuar como um supressor de tumor, especificamente, um supressor de metástases.

Por outro lado, a baixa expressão de ADAM33, nos tumores, foi relacionada com RE-/ PR- e, com a positividade para EGFR, CK5 / 6, CK17 e c-Kit. Esse painel de proteínas estudados vem sendo relacionado como preditor de TNG e BLBC. Foi demonstrado que a baixa expressão de ADAM33 está relacionada com os subtipos tumorais de câncer de mama mais agressivos, o que corresponde a TNG e BLBC.

Outros testes estatísticos mostraram, de modo mais evidente, a relevância da presença da proteína ADAM33 nos tumores. Após a análise dos dados clínico-patológicos, foi aplicado o teste estatístico de Kaplan Meier, que avalia o conjunto de fatores em relação ao tempo de sobrevida global e sobrevida livre de metástases das pacientes. Nesse teste, as pacientes cujos tumores foram atribuídos ao escore 2 e 3 de ADAM33, tiveram uma sobrevida livre de metástase significativamente menor em comparação às pacientes cujos tumores foram atribuídos ao escore 4 de ADAM33 ($p = 0,016$ e $p = 0,008$, respectivamente) (FIGURA 13A e B). Esses resultados demonstram uma concordância com a análise inicial, ou seja, a ausência de metástases e morte está diretamente relacionada ao escore 4 de ADAM33.

Outro teste estatístico, a regressão de Cox, procura definir se um marcador pode ter valor independente de outras variáveis como fator prognóstico. A análise inicial univariada seguida da multivariada demonstrou, de fato, que a ausência da proteína ADAM33 está relacionada com um alto risco de metástase (HR 0,581; 95% CI 0,365-0,923, $p = 0,021$) e diminuição da sobrevida global (HR 0,464; 95% CI 0,253-0,848, $p = 0,013$) (TABELA 3).

Esse resultado corrobora com a baixa expressão da ADAM33 em tumores que são mais agressivos, observado pelos escores 2 e 3 de ADAM33 nos tumores TNG e BLBC, que apresentam altas taxas de invasão e metástases e menor sobrevida global.

As pacientes com TNG e BLBC normalmente apresentam pior prognóstico quando comparadas às pacientes com outros subtipos de câncer de mama devido ao

seu comportamento clínico mais agressivo, que muitas vezes afeta indivíduos mais jovens, e não possuem alvos terapêuticos conhecidos (NIELSEN et al., 2004; CHEANG et al., 2008; DAI et al., 2015; BIANCHINI et al., 2016). A característica de pacientes mais jovens serem acometidas pelos TNG está geralmente relacionada com a predisposição genética, uma vez que mutações em *BRCA1* e *TP53* são frequentemente encontradas nos TNG. As proteínas *BRCA1* e *BRCA2* são supressoras tumorais, essenciais na divisão celular, no controle do reparo do DNA replicado e na apoptose. *BRCA1* e *p53* são responsáveis por manter a integridade e a estabilidade genômica. Outras alterações como amplificações e mutações podem ser observadas em genes como *c-MYC*, *PI3KCA*, *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *EGFR1*, e amplificação dos genes *KIT* (BIANCHINI et al., 2016; DAI et al., 2016).

Cerca de 80% dos TNG são BLBC, os quais em geral, expressam genes característicos de células mioepiteliais, como *KRT5*, *KRT14* e *KRT17* (CK5, CK14 e CK17) e *EGFR*. A amplificação ou alterações estruturais, causadas por mutações tornam o *EGFR* ativado independente da presença de ligantes específicos, entre eles o *EGF*, que atua direta ou indiretamente na transdução de sinais, regulando a expressão de genes envolvidos em sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação celular. Os efeitos do *EGFR* são mediados principalmente através da via de sinalização *PI3K/AKT* (HOLDMAN et al., 2015; BIANCHINI et al., 2016; NAKAI; HUNG; YAMAGUCHI, 2016). Esse é um dos mecanismos carcinogênicos que levam ao desenvolvimento desse tipo tumoral. Além de driblar os mecanismos de reparo do DNA, tem alta capacidade de replicação celular e pode ser ativada por diversos mecanismos, evidenciando a agressividade dessa doença.

Apesar dos BLBC apresentarem expressão de *EGFR*, esse evento por si só não tem se mostrado capaz de ser utilizado como um alvo de terapia. Existem terapias específicas para tumores que expressam *EGFR*, como o uso de mAb que tem se mostrado eficientes nos tumores de pulmão, cólon, cabeça e pescoço ou ainda os inibidores de tirosina quinase (TKi) para tumores que expressam esse fator mutado e com alta capacidade de ativação da proliferação celular. No entanto, até o momento, os estudos clínicos de câncer de mama, utilizando essas 2 abordagens terapêuticas mostram que não há um aumento na sobrevida livre de doença das pacientes (NAKAI; HUNG; YAMAGUCHI, 2016). Uma razão plausível para a falta de resposta a terapias específicas atuais é que a maioria dos TNGs não são exclusivamente dependentes da sinalização de *EGFR* para a sua sobrevivência. A provável resposta envolve as

diversas vias de ativação da proliferação que ocorrem nos TNGs. Além de não apresentarem alvo terapêutico específico, são tumores altamente heterogêneos, acumulam diversas alterações, as quais direcionam ao alto grau tumoral, alta capacidade proliferativa e metastática (BIANCHINI et al., 2016; NAKAI; HUNG; YAMAGUCHI, 2016).

Dentre os TNG não há diferença significativa em termos de taxa de resposta patológica completa (pCR) ou a sobrevivência após a quimioterapia neoadjuvante, e esses tumores tem mostrado benefício semelhante com compostos derivados de sais de platina (Carboplatina e Cisplatina) e os inibidores de PARP (poli ADP ribose polimerase). Quimioterápicos que causam danos ao DNA, levando as células incapazes de promover o reparo à apoptose. A instabilidade intrínseca do TNG em reparar o DNA faz com que esse tipo de terapia tenha sucesso (BIANCHINI et al., 2016).

Outras proteínas da família ADAM mostraram ter papel relevante no câncer de mama. A ADAM12 já foi descrita em diversos estudos, sendo evidenciado o aumento da expressão da proteína no câncer de mama. Li et al (2013) mostraram que a expressão de uma variável de *splicing*, ADAM12L (variável transmembrana longa), estava relacionada com a diminuição do tempo de vida livre de metástases nos carcinomas TNG, e isso foi atribuído ao fato de ADAM12L ativar EGFR. Ruff et al (2015) relataram que essa proteína pode ser um marcador de transição epitelial-mesenquimal, pois, após a expressão dessa proteína, em linhagens normais de mama (MCF10), tiveram perda de polaridade, reorganização do citoesqueleto e expressaram proteínas de transição epitelial-mesenquimal (NARIȦ et al., 2010; ROY et al., 2011; LI et al., 2012, 2013; RUFF et al., 2015).

A ADAM10 foi relacionada com a invasão e progressão tumoral, observado após o bloqueio da expressão dessa proteína em linhagens tumorais de mama, as quais apresentaram a capacidade de invasão diminuída. O aumento RNAm da ADAM10 foi relacionada com carcinomas do tipo BLBC (MULLOOLY et al., 2015).

A ADAM15 se mostrou envolvida na progressão tumoral, em análise *in vitro*, utilizando linhagens MDA-MB-231 lucD3H2LN. Nesse estudo, o *knockdown* da ADAM15 por siRNA resultou na inibição da proliferação de células de câncer de mama *in vitro*, enquanto o bloqueio das interações entre ADAM15 e integrinas por anticorpo anti-ADAM15 falhou em inibir a proliferação celular, indicando que ADAM15 está envolvida na proliferação celular, independente de integrinas. Ao contrário, a invasão

celular se mostrou significativamente inibida pelos anticorpos anti-ADAM15, anti- $\alpha 9\beta 1$ e anti- $\alpha v\beta 3$, indicando que a interação integrinas-ADAM15 está envolvida na invasão dessa linhagem celular (OTA et al., 2012).

A ADAM17 apresenta a expressão aumenta no câncer de mama em comparação com a mama normal, e está associada como desenvolvimento e a progressão tumoral (MCGOWAN et al., 2007, 2008). Caiazza et al (2015) demonstraram em linhagens tumorais de mama do tipo TNG, que após o uso de mAb anti-ADAM17, houve a diminuição da viabilidade e motilidade celular e aumento da morte celular (CAIAZZA et al., 2015).

A ADAM23 mostrou estar envolvida com o câncer de mama, onde o silenciamento desse gene por hipermetilação da região promotora do DNA foi relacionada com alta incidência de metástase e redução da sobrevida livre de doença (COSTA et al., 2004; VERBISCK, N. M.; COSTA, E. T.; COSTA, 2009). Em estudos recentes, Costa et al (2014) mostraram a existência de uma expressão heterogênea dessa proteína no tumor primário de mama. O silenciamento do gene *ADAM23* observado durante a progressão tumoral, gera uma subpopulação de células ADAM23-negativas em um tumor ADAM23-positiva. A disseminação metastática e a malignidade é, de fato, conduzido pela coexistência e interação entre ADAM23-negativa e a população ADAM23-positiva do tumor primário (COSTA et al., 2014).

Em nosso estudo, podemos observar que a proteína ADAM33 se apresenta de forma diferente nos subtipos moleculares de câncer de mama, sendo que tumores mais agressivos (TNG e BLBC) apresentam uma expressão diminuída dessa proteína. Este fato nos faz pensar, que a ADAM33 contribui na biologia do câncer de mama, pois, pode estar envolvida no aumento da agressividade tumoral e no desenvolvimento das metástases.

Foi evidenciado pela primeira vez que a proteína ADAM33, em conjunto com os biomarcadores atualmente disponíveis, pode ser utilizado como um novo marcador de prognóstico do câncer de mama, pois a diminuição da expressão dessa proteína está associada ao risco de desenvolvimento de metástases e morte. Além disso, a baixa expressão de ADAM33 no câncer de mama tem um valor prognóstico independente.

Estudos futuros buscando esclarecer os fundamentos da participação da proteína ADAM33 no contexto da malignidade do câncer de mama são necessários e podem contribuir para o melhor entendimento da proteína no processo de metástase

e da agressividade tumoral. A elucidação do mecanismo patológico do câncer de mama é de extrema importância, pois, contribui e direciona para o desenvolvimento de novos tratamentos de uma patologia tão frequente e temida entre as mulheres de todo o mundo.

7. CONCLUSÃO

O hibridoma GMGK06 produzido, gerou anticorpos monoclonais contra a proteína ADAM33. Assim, foi possível utilizá-lo para avaliar a expressão da proteína ADAM33 como marcador de câncer de mama. A baixa expressão da proteína ADAM33 foi relacionada com TNG e BLBC, e com uma menor sobrevida global e sobrevida livre de metástases. O achado mais importante deste trabalho é que a baixa expressão de ADAM33 no câncer de mama tem um valor prognóstico independente. A diminuição da expressão dessa proteína está associada ao risco de desenvolvimento de metástases e morte. Assim, a avaliação de ADAM33 por IHQ poderia ser utilizado como um marcador de prognóstico para os subtipos TNG e BLBC.

BIBLIOGRAFIA

ABD EL-REHIM, D. M.; PINDER, S. E.; PAISH, C. E.; BELL, J.; BALMEY, R. W.; ROBERTSON, J. F. R.; NICHOLSON, R. I.; ELLIS, I. O. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 203, n. April, p. 661–671, 2004.

ANBALAGAN, M.; ROWAN, B. G. Molecular and Cellular Endocrinology Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, p. 264–272, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.016>>.

ARRIBAS, BECH-SERRA, SANTIAGO-JOSEFAT. ADAMs , cell migration and cancer. **Rev Cancer Metastasis**, v. 2, p. 57–68, 2006.

BANE, A. L.; TJAN, S.; PARKES, R. K.; ANDRULIS, I.; O'MALLEY, F. P. Invasive lobular carcinoma: to grade or not to grade. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 18, n. 5, p. 621–8, maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15605082>>. Acesso em: 24 jul. 2012.

BAURAKIADES, E.; COSTA, V. H.; RABONI, S. M.; DE ALMEIDA, V. R. T.; LARSEN, K. S. K.; KOHLER, J. N.; GOZZO, P. D. C.; KLASSEN, G.; MANICA, G. C. M.; DE NORONHA, L. The roles of ADAM33, ADAM28, IL-13 and IL-4 in the development of lung injuries in children with lethal non-pandemic acute infectious pneumonia. **Journal of Clinical Virology**, v. 61, n. 4, p. 585–589, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653214003746>>.

BERGEN, E. S.; TICHY, C.; BERGHOFF, A. S.; RUDAS, M.; DUBSKY, P.; BAGO-HORVATH, Z.; MADER, R. M.; EXNER, R.; GNANT, M.; ZIELINSKI, C. C.; STEGER, G. G.; PREUSSER, M.; BARTSCH, R. Prognostic impact of breast cancer subtypes in elderly patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 157, n. 1, p. 91–99, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-016-3787-y>>.

BERX, G.; VAN ROY, F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. **Breast cancer research : BCR**, v. 3, n. 5, p. 289–93, jan. 2001. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=138690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BIANCHINI, G.; BALKO, J. M.; MAYER, I. A.; SANDERS, M. E.; GIANNI, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease.

Nature Reviews Clinical Oncology, 2016. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrclinonc.2016.66>>.

BIGLIA, N.; MARIANI, L.; SGRO, L.; MININANNI, P.; MOGGIO, G.; SISMONDI, P.

Increased incidence of lobular breast cancer in women treated with hormone replacement therapy: implications for diagnosis, surgical and medical treatment.

Endocrine-related cancer, v. 14, n. 3, p. 549–67, set. 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914088>>. Acesso em: 2 ago. 2012.

BLOWS, F. M.; DRIVER, K. E.; SCHMIDT, M. K.; BROEKS, A.; VAN LEEUWEN, F. E.; WESSELING, J.; CHEANG, M. C.; GELMON, K.; NIELSEN, T. O.; BLOMQVIST, C.; HEIKKILA, P.; HEIKKINEN, T.; NEVANLINNA, H.; AKSLEN, L. A.; B??GIN, L. R.; FOULKES, W. D.; COUCH, F. J.; WANG, X.; CAFOUREK, V.; OLSON, J. E.; BAGLIETTO, L.; GILES, G. G.; SEVERI, G.; MCLEAN, C. A.; SOUTHEY, M. C.; RAKHA, E.; GREEN, A. R.; ELLIS, I. O.; SHERMAN, M. E.; LISSOWSKA, J.; ANDERSON, W. F.; COX, A.; CROSS, S. S.; REED, M. W. R.; PROVENZANO, E.; DAWSON, S. J.; DUNNING, A. M.; HUMPHREYS, M.; EASTON, D. F.; GARC??A-CLOSAS, M.; CALDAS, C.; PHAROAH, P. D.; HUNTSMAN, D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 5, 2010.

BROCHET, X.; LEFRANC, M. IMGT / V-QUEST : the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis.

Nucleic Acids Research, v. 36, n. May, p. 503–508, 2008.

CAIAZZA, F.; MCGOWAN, P. M.; MULLOOLY, M.; MURRAY, A.; SYNNOTT, N.;

DONOVAN, N. O.; FLANAGAN, L.; TAPE, C. J. Targeting ADAM-17 with an inhibitory monoclonal antibody has antitumour effects in triple-negative breast cancer cells. **British Journal of Cancer**, n. April, p. 1895–1903, 2015.

CAKEBREAD, J. a; HAITCHI, H.-M.; HOLLOWAY, J. W.; POWELL, R. M.; KEITH,

T.; DAVIES, D. E.; HOLGATE, S. T. The role of ADAM33 in the pathogenesis of asthma. **Springer seminars in immunopathology**, v. 25, n. 3–4, p. 361–75, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999429>>. Acesso em: 27 jul. 2012.

CAO, A.-Y.; HUANG, L.; WU, J.; LU, J.-S.; LIU, G.-Y.; SHEN, Z.-Z.; SHAO, Z.-M.; DI, G.-H. Tumor characteristics and the clinical outcome of invasive lobular carcinoma compared to infiltrating ductal carcinoma in a Chinese population. **World journal of surgical oncology**, v. 10, n. 1, p. 152, 17 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805492>>. Acesso em: 2 ago. 2012.

CARCOFORO, P.; RAIJI, M.; LANGAN, R. Infiltrating Lobular Carcinoma of the Breast Presenting as Gastrointestinal Obstruction: A Mini Review. **Journal of Cancer of Cancer**, p. 11–15, 2012. Disponível em: <<http://jcancer.org/v03p0328.pdf>>. Acesso em: 6 ago. 2012.

CARTER, C. L.; ALLEN, C.; HENSON, D. E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer**, v. 63, n. 1, p. 181–187, 1989.

CHEANG, M. C. U.; MARTIN, M.; NIELSEN, T. O.; PRAT, A.; VODUC, D.; RODRIGUEZ-LESCURE, A.; RUIZ, A.; CHIA, S.; SHEPHERD, L.; RUIZ-BORREGO, M.; CALVO, L.; ALBA, E.; CARRASCO, E.; CABALLERO, R.; TU, D.; PRITCHARD, K. I.; LEVINE, M. N.; BRAMWELL, V. H.; PARKER, J.; BERNARD, P. S.; ELLIS, M. J.; PEROU, C. M.; DI LEO, A.; CAREY, L. A. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. **The oncologist**, v. 20, n. 5, p. 474–82, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4425383&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHEANG, M. C. U.; VODUC, D.; BAJDIK, C.; LEUNG, S.; MCKINNEY, S.; CHIA, S. K.; PEROU, C. M.; NIELSEN, T. O. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368–1376, 2008.

CHRISTGEN, M.; DERKSEN, P. W. Lobular breast cancer: molecular basis, mouse and cellular models. **Breast Cancer Research**, v. 17, p. 1–9, 2015. Disponível em:

<<http://breast-cancer-research.com/content/17/1/16>>.

COSTA, E. T.; BARNABÉ, G. F.; LI, M.; DIAS, a a M.; MACHADO, T. R.; ASPRINO, P. F.; CAVALHER, F. P.; FERREIRA, E. N.; DEL MAR INDA, M.; NAGAI, M. H.; MALNIC, B.; DUARTE, M. L.; LEITE, K. R. M.; DE BARROS, a C. S. D.; CARRARO, D. M.; CHAMMAS, R.; ARMELIN, H. a; CAVENEE, W.; FURNARI, F.; CAMARGO, a a. Intratumoral heterogeneity of ADAM23 promotes tumor growth and metastasis through LIG4 and nitric oxide signals. **Oncogene**, n. January 2014, p. 1270–1279, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662834>>.

COSTA, F. F.; VERBISCK, N. V.; SALIM, A. C. M.; IERARDI, D. F.; PIRES, L. C.; SASAHARA, R. M.; SOGAYAR, M. C.; ZANATA, S. M.; MACKAY, A.; O'HARE, M.; SOARES, F.; SIMPSON, A. J. G.; CAMARGO, A. a. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, n. 7, p. 1481–8, 19 fev. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661055>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

DAI, X.; CHEN, A.; BAI, Z. Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. **Scientific reports**, v. 4, p. 6566, 2014. Disponível em:

<<http://www.nature.com/srep/2014/141023/srep06566/full/srep06566.html>>.

DAI, X.; LI, Y.; BAI, Z.; TANG, X. Molecular portraits revealing the heterogeneity of breast tumor subtypes defined using immunohistochemistry markers. **Nature Publishing Group**, n. August, p. 1–10, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/srep14499>>.

DAI, X.; XIANG, L.; LI, T.; BAI, Z. Cancer Hallmarks , Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, 2016.

DENDULURI, N.; SOMER, M. R.; EISEN, A.; HOLLOWAY, J. N.; HURRIA, A.; KING, T. A. Selection of Optimal Adjuvant Chemotherapy Regimens for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) – Negative and Adjuvant Targeted Therapy for HER2-Positive Breast Cancers : An American Society of Clinical Oncology Guideline Adaptation of the Canc. **Journal of clinical oncology**, 2016.

DOWSETT, M.; NIELSEN, T. O.; A'HERN, R.; BARTLETT, J.; COOMBES, R. C.;

CUZICK, J.; ELLIS, M.; HENRY, N. L.; HUGH, J. C.; LIVELY, T.; MCSHANE, L.;
PAIK, S.; PENAULT-LLORCA, F.; PRUDKIN, L.; REGAN, M.; SALTER, J.;
SOTIRIOU, C.; SMITH, I. E.; VIALE, G.; ZUJEWSKI, J. A.; HAYES, D. F.
Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67
in breast cancer working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n.
22, p. 1656–1664, 2011.

DUFFY, M. J.; MULLOOLY, M.; O'DONOVAN, N.; SUKOR, S.; CROWN, J.;
PIERCE, A.; MCGOWAN, P. M. The ADAMs family of proteases: new biomarkers
and therapeutic targets for cancer? **Clinical proteomics**, v. 8, n. 1, p. 9, jan. 2011.
Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 jul. 2012.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM
metalloproteinases. **Molecular aspects of medicine**, v. 29, n. 5, p. 258–89, out.
2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762209>>. Acesso em:
15 jul. 2012.

EERDEWEGH, P. Van; LITTLE, R. D.; MASTRO, R. G. Del; FALLS, K.; SIMON, J.;
TORREY, D.; PANDIT, S.; MCKENNY, J.; BRAUNSCHWEIGER, K.; WALSH, A.;
LIU, Z.; HAYWARD, B.; FOLZ, C.; MANNING, S. P.; BAWA, A.; SARACINO, L.;
THACKSTON, M.; BENCHEKROUN, Y.; CAPPARELL, N.; WANG, M.; ADAIR, R.;
FENG, Y.; DUBOIS, J.; FITZGERALD, M. G.; HUANG, H.; ALLEN, K. M.; PEDAN,
A.; DANZIG, M. R.; UMLAND, S. P.; EGAN, R. W.; CUSS, F. M.; RORKEK, S.;
CLOUGHK, J. B.; HOLLOWAYK, J. W.; HOLGATEK, S. T.; KEITH, T. P. Association
of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Nature**, v.
418, n. July, p. 426–430, 2002.

ELSTON AND ELLIS. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of
histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term
follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, 1991.

EROLE, P.; BOSCH, A.; ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO, J.; LLUCH, A. Molecular
biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer
treatment reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, out. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178455>>. Acesso em: 18 jul. 2012.

ESWARAN, J.; CYANAM, D.; MUDVARI, P.; REDDY, S. D. N.; PAKALA, S. B.; NAIR, S. S.; FLOREA, L.; FUQUA, S. a W.; GODBOLE, S.; KUMAR, R. Transcriptomic landscape of breast cancers through mRNA sequencing. **Scientific reports**, v. 2, p. 264, jan. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355776>>. Acesso em: 13 jul. 2012.

ETO, K.; HUET, C.; TARUI, T.; KUPRIYANOV, S.; LIU, H.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; ZHANG, X.; SHEPPARD, D.; ENGVALL, E.; TAKADA, Y. Functional Classification of ADAMs Based on a Conserved Motif for Binding to Integrin $\alpha 9 \beta 1$. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17804–17810, 2002.

FELDINGER, K.; GENERALI, D.; KRAMER-MAREK, G.; GIJSEN, M.; NG, T. B.; WONG, J. H.; STRINA, C.; CAPPELLETTI, M.; ANDREIS, D.; LI, J.-L.; BRIDGES, E.; TURLEY, H.; LEEK, R.; ROXANIS, I.; CAPALA, J.; MURPHY, G.; HARRIS, A. L.; KONG, A. ADAM10 mediates trastuzumab resistance and is correlated with survival in HER2 positive breast cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 16, 2014. Disponível em: <[http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=1955&path\[\]=2741](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=1955&path[]=2741)>.

FIELDS, C.; O'CONNELL, D.; XIAO, S.; LEE, G. U.; BILLIALD, P.; MUZARD, J. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature protocols**, v. 8, n. 6, p. 1125–48, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680984>>.

FOLEY, S. C.; MOGAS, A. K.; OLIVENSTEIN, R.; Fiset, P. O.; CHAKIR, J.; BOURBEAU, J.; ERNST, P.; LEMIÈRE, C.; MARTIN, J. G.; HAMID, Q. Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 4, p. 863–871, 2007.

GARLISI, C. G.; ZOU, J.; DEVITO, K. E.; TIAN, F.; ZHU, F. X.; LIU, J.; SHAH, H.; WAN, Y.; MOTASIM BILLAH, M.; EGAN, R. W.; UMLAND, S. P. Human ADAM33: protein maturation and localization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 1, p. 35–43, jan. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X02029765>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

GILLET, J.-P.; VARMA, S.; GOTTESMAN, M. M. The clinical relevance of cancer cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 7, p. 452–8, 3 abr. 2013.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3691946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 maio. 2014.

GIT, A.; SPITERI, I.; BLENKIRON, C.; DUNNING, M. J.; POLE, J. C. M.; CHIN, S.-F.; WANG, Y.; SMITH, J.; LIVESEY, F. J.; CALDAS, C. PMC42, a breast progenitor cancer cell line, has normal-like mRNA and microRNA transcriptomes. **Breast cancer research : BCR**, v. 10, n. 3, p. R54, jan. 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2481505&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 jul. 2014.

GLOYESKE, N. C.; WOODARD, A. H.; ELISHAEV, E.; YU, J.; CLARK, B. Z.; DABBS, D. J.; BHARGAVA, R. Immunohistochemical Profile of Breast Cancer With Respect to Estrogen Receptor and HER2 Status. v. 0, n. 0, p. 1–7, 2014.

GOMES, D. S.; BALABRAM, D.; PORTO, S. S.; GOBBI, H. Lobular neoplasia: frequency and association with other breast lesions. **Diagnostic pathology**, v. 6, n. 1, p. 74, jan. 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 ago. 2012.

HAITCHI, H. M.; POWELL, R. M.; SHAW, T. J.; HOWARTH, P. H.; WILSON, S. J.; WILSON, D. I.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. ADAM33 expression in asthmatic airways and human embryonic lungs. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 9, p. 958–65, 1 maio 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709049>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011. Disponível em:

<<http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>>.

HARIGOPAL, M.; SHIN, S. J.; MURRAY, M. P.; TICKOO, S. K.; BROGI, E.; ROSEN, P. P. Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma. **World journal of surgical oncology**, v. 3, p. 73, 14 nov. 2005. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1308872&tool=pmcentrez>>

z&rendertype=abstract>. Acesso em: 24 jul. 2012.

HARRIS, R. a; EICHHOLTZ, T. J.; HILES, I. D.; PAGE, M. J.; O'HARE, M. J. New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells.

International journal of cancer. Journal international du cancer, v. 80, n. 3, p. 477–84, 29 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9935193>>.

HARRIS, R. a; HILES, I. D.; PAGE, M. J.; O'HARE, M. J. The induction of apoptosis in human mammary luminal epithelial cells by expression of activated c-neu and its abrogation by glucocorticoids. **British journal of cancer**, v. 72, n. 2, p. 386–92, ago. 1995. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2033972&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HOLDMAN, X. B.; WELTE, T.; RAJAPAKSHE, K.; POND, A.; COARFA, C.; MO, Q.; HUANG, S.; HILSENBECK, S. G.; EDWARDS, D. P.; ZHANG, X.; ROSEN, J. M. Upregulation of EGFR signaling is correlated with tumor stroma remodeling and tumor recurrence in FGFR1-driven breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 141, 2015. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/17/1/141>>.

HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E.; POWELL, R. M.; HOLLOWAY, J. W. ADAM33: a newly identified gene in the pathogenesis of asthma. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 655–68, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257631>>. Acesso em: 27 jul. 2012.

HUANG, B.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.-åke. Molecular and Cellular Endocrinology Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, p. 240–244, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.015>>.

HUANG, J.; BRIDGES, L. C.; WHITE, J. M. Selective Modulation of Integrin-mediated Cell Migration by Distinct ADAM Family Members □. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. October, p. 4982–4991, 2005.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B.; FRÖHLICH, C.; LOECHEL, F.;

ZOLKIEWSKA, a; ISHIGURO, K.; KOJIMA, T.; LIU, W.; LANGFORD, J. K.; SANDERSON, R. D.; BRAKEBUSCH, C.; FÄSSLER, R.; WEWER, U. M. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. **The Journal of cell biology**, v. 149, n. 5, p. 1143–56, 29 maio 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; WEWER, U. M. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **The American journal of pathology**, v. 154, n. 5, p. 1489–501, maio 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866592&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

INANC, M.; OZKAN, M.; KARACA, H.; BERK, V.; BOZKURT, O.; DURAN, A. O.; OZASLAN, E.; AKGUN, H.; TEKELIOGLU, F.; ELMALI, F. Cytokeratin 5/6, c-Met expressions, and PTEN loss prognostic indicators in triple-negative breast cancer. **Medical Oncology**, v. 31, 2014.

INCA. **Estimativa 2012: Incidência de cancer no Brasil**. [s.l: s.n.].

INCA. Estimativa 2016- Incidência de Câncer no Brasil. 2016.

KAO, J.; SALARI, K.; BOCANEGRA, M.; CHOI, Y.-L.; GIRARD, L.; GANDHI, J.; KWEI, K. a; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; WANG, P.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; POLLACK, J. R. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6146, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2702084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 maio. 2014.

KASHIWAGI, S.; YASHIRO, M.; TAKASHIMA, T.; AOMATSU, N.; IKEDA, K.; OGAWA, Y.; ISHIKAWA, T.; HIRAKAWA, K. Advantages of adjuvant chemotherapy for patients with triple-negative breast cancer at Stage II: usefulness of prognostic markers E-cadherin and Ki67. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 6, p. R122, jan. 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3326564&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 ago. 2012.

KOBOLDT, D. C.; FULTON, R. S.; MCLELLAN, M. D.; SCHMIDT, H.; KALICKI-VEIZER, J.; MCMICHAEL, J. F.; FULTON, L. L.; DOOLING, D. J.; DING, L.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; ALLY, A.; BALASUNDARAM, M.; BUTTERFIELD, Y. S. N.; CARLSEN, R.; CARTER, C.; CHU, A.; CHUAH, E.; CHUN, H.-J. E.; COOPE, R. J. N.; DHALLA, N.; GUIN, R.; HIRST, C.; HIRST, M.; HOLT, R. a.; LEE, D.; LI, H. I.; MAYO, M.; MOORE, R. a.; MUNGALL, A. J.; PLEASANCE, E.; GORDON ROBERTSON, a.; SCHEIN, J. E.; SHAFIEI, A.; SIPAHIMALANI, P.; SLOBODAN, J. R.; STOLL, D.; TAM, A.; THIESSEN, N.; VARHOL, R. J.; WYE, N.; ZENG, T.; ZHAO, Y.; BIROL, I.; JONES, S. J. M.; MARRA, M. a.; CHERNIACK, A. D.; SAKSENA, G.; ONOFRIO, R. C.; PHO, N. H.; CARTER, S. L.; SCHUMACHER, S. E.; TABAK, B.; HERNANDEZ, B.; GENTRY, J.; NGUYEN, H.; CRENSHAW, A.; ARDLIE, K.; BEROUKHIM, R.; WINCKLER, W.; GETZ, G.; GABRIEL, S. B.; MEYERSON, M.; CHIN, L.; PARK, P. J.; KUCHERLAPATI, R.; HOADLEY, K. a.; TODD AUMAN, J.; FAN, C.; TURMAN, Y. J.; SHI, Y.; LI, L.; TOPAL, M. D.; HE, X.; CHAO, H.-H.; PRAT, A.; SILVA, G. O.; IGLESIA, M. D.; ZHAO, W.; USARY, J.; BERG, J. S.; ADAMS, M.; BOOKER, J.; WU, J.; GULABANI, A.; BODENHEIMER, T.; HOYLE, A. P.; SIMONS, J. V.; SOLOWAY, M. G.; MOSE, L. E.; JEFFERYS, S. R.; BALU, S.; PARKER, J. S.; NEIL HAYES, D.; PEROU, C. M.; MALIK, S.; MAHURKAR, S.; SHEN, H.; WEISENBERGER, D. J.; TRICHE JR, T.; LAI, P. H.; BOOTWALLA, M. S.; MAGLINTE, D. T.; BERMAN, B. P.; VAN DEN BERG, D. J.; BAYLIN, S. B.; LAIRD, P. W.; CREIGHTON, C. J.; DONEHOWER, L. a.; GETZ, G.; NOBLE, M.; VOET, D.; SAKSENA, G.; GEHLENBORG, N.; DICARA, D.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; WU, C.-J.; YINGCHUN LIU, S.; LAWRENCE, M. S.; ZOU, L.; SIVACHENKO, A.; LIN, P.; STOJANOV, P.; JING, R.; CHO, J.; SINHA, R.; PARK, R. W.; NAZAIRE, M.-D.; ROBINSON, J.; THORVALDSDOTTIR, H.; MESIROV, J.; PARK, P. J.; CHIN, L.; REYNOLDS, S.; KREISBERG, R. B.; BERNARD, B.; BRESSLER, R.; ERKKILA, T.; LIN, J.; THORSSON, V.; ZHANG, W.; SHMULEVICH, I.; CIRIELLO, G.; WEINHOLD, N.; SCHULTZ, N.; GAO, J.; CERAMI, E.; GROSS, B.; JACOBSEN, A.; SINHA, R.; ARMAN AKSOY, B.; ANTIPIN, Y.; REVA, B.; SHEN, R.; TAYLOR, B. S.; LADANYI, M.; SANDER, C.; ANUR, P.; SPELLMAN, P. T.; LU, Y.; LIU, W.; VERHAAK, R. R. G.; MILLS, G. B.; AKBANI, R.; ZHANG, N.; BROOM, B.

M.; CASASENT, T. D.; WAKEFIELD, C.; UNRUH, A. K.; BAGGERLY, K.;
 COOMBES, K.; WEINSTEIN, J. N.; HAUSSLER, D.; BENZ, C. C.; STUART, J. M.;
 BENZ, S. C.; ZHU, J.; SZETO, C. C.; SCOTT, G. K.; YAU, C.; PAULL, E. O.;
 CARLIN, D.; WONG, C.; SOKOLOV, A.; THUSBERG, J.; MOONEY, S.; NG, S.;
 GOLDSTEIN, T. C.; ELLROTT, K.; GRIFFORD, M.; WILKS, C.; MA, S.; CRAFT, B.;
 YAN, C.; HU, Y.; MEERZAMAN, D.; GASTIER-FOSTER, J. M.; BOWEN, J.;
 RAMIREZ, N. C.; BLACK, A. D.; XPATH ERROR: UNKNOWN VARIABLE "TNAME".,
 R. E.; WHITE, P.; ZMUDA, E. J.; FRICK, J.; LICHTENBERG, T. M.; BROOKENS, R.;
 GEORGE, M. M.; GERKEN, M. a.; HARPER, H. a.; LERAAS, K. M.; WISE, L. J.;
 TABLER, T. R.; MCALLISTER, C.; BARR, T.; HART-KOTHARI, M.; TARVIN, K.;
 SALLER, C.; SANDUSKY, G.; MITCHELL, C.; IACocca, M. V.; BROWN, J.;
 RABENO, B.; CZERWINSKI, C.; PETRELLI, N.; DOLZHANSKY, O.; ABRAMOV, M.;
 VORONINA, O.; POTAPOVA, O.; MARKS, J. R.; SUCHORSKA, W. M.; MURAWA,
 D.; KYCLER, W.; IBBS, M.; KORSKI, K.; SPYCHAŁA, A.; MURAWA, P.;
 BRZEZIŃSKI, J. J.; PERZ, H.; ŁAŻNIAK, R.; TERESIAK, M.; TATKA, H.;
 LEPOROWSKA, E.; BOGUSZ-CZERNIEWICZ, M.; MALICKI, J.; MACKIEWICZ, A.;
 WIZNEROWICZ, M.; VAN LE, X.; KOHL, B.; VIET TIEN, N.; THORP, R.; VAN
 BANG, N.; SUSSMAN, H.; DUC PHU, B.; HAJEK, R.; PHI HUNG, N.; VIET THE
 PHUONG, T.; QUYET THANG, H.; ZAKI KHAN, K.; PENNY, R.; MALLERY, D.;
 CURLEY, E.; SHELTON, C.; YENA, P.; INGLE, J. N.; COUCH, F. J.; LINGLE, W. L.;
 KING, T. a.; MARIA GONZALEZ-ANGULO, A.; MILLS, G. B.; DYER, M. D.; LIU, S.;
 MENG, X.; PATANGAN, M.; WALDMAN, F.; STÖPPLER, H.; KIMRYN RATHMELL,
 W.; THORNE, L.; HUANG, M.; BOICE, L.; HILL, A.; MORRISON, C.; GAUDIOSO,
 C.; BSHARA, W.; DAILY, K.; EGEA, S. C.; PEGRAM, M. D.; GOMEZ-FERNANDEZ,
 C.; DHIR, R.; BHARGAVA, R.; BRUFISKY, A.; SHRIVER, C. D.; HOOKE, J. a.;
 LEIGH CAMPBELL, J.; MURAL, R. J.; HU, H.; SOMIARI, S.; LARSON, C.;
 DEYARMIN, B.; KVECHER, L.; KOVATICH, A. J.; ELLIS, M. J.; KING, T. a.; HU, H.;
 COUCH, F. J.; MURAL, R. J.; STRICKER, T.; WHITE, K.; OLOPADE, O.; INGLE, J.
 N.; LUO, C.; CHEN, Y.; MARKS, J. R.; WALDMAN, F.; WIZNEROWICZ, M.; BOSE,
 R.; CHANG, L.-W.; BECK, A. H.; MARIA GONZALEZ-ANGULO, A.; PIHL, T.;
 JENSEN, M.; SFEIR, R.; KAHN, A.; CHU, A.; KOTHIYAL, P.; WANG, Z.; SNYDER,
 E.; PONTIUS, J.; AYALA, B.; BACKUS, M.; WALTON, J.; BABOUD, J.; BERTON, D.;
 NICHOLLS, M.; SRINIVASAN, D.; RAMAN, R.; GIRSHIK, S.; KIGONYA, P.;
 ALONSO, S.; SANBHADTI, R.; BARLETTA, S.; POT, D.; SHETH, M.; DEMCHOK, J.

a.; MILLS SHAW, K. R.; YANG, L.; ELEY, G.; FERGUSON, M. L.; TARNUZZER, R. W.; ZHANG, J.; DILLON, L. a. L.; BUETOW, K.; FIELDING, P.; OZENBERGER, B. a.; GUYER, M. S.; SOFIA, H. J.; PALCHIK, J. D. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012.

KOS, Z.; DABBS, D. J.; KOS, Z.; DABBS, D. J. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. **Histopathology**, p. 70–85, 2016.

KRISTIANSEN, G.; PILARSKY, C. Molecular pathology of Invasive Lobular Breast Carcinoma. **Breast disease**, v. 30, p. 9–14, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850990>>. Acesso em: 25 jul. 2012.

KUANG, W. W.; THOMPSON, D. a; HOCH, R. V; WEIGEL, R. J. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. **Nucleic acids research**, v. 26, n. 4, p. 1116–23, 15 fev. 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147366&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 83, n. 3, p. 249–89, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758095>>.

LACROIX & LECLERCQ. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast cancer research and treatment**, v. 83, n. 3, p. 249–89, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758095>>.

LEE, J. Y.; PARK, S. W.; HEE, K. C.; HO, Y. K.; RHIM, T.; LEE, J. H.; JANG, A. S.; KOH, E. S.; PARK, C. S. A disintegrin and metalloproteinase 33 protein in patients with asthma: Relevance to airflow limitation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 7, p. 729–735, 2006.

LI, H.; DUHACHEK-MUGGY, S.; DUBNICKA, S.; ZOLKIEWSKA, A. Metalloproteinase-disintegrin ADAM12 is associated with a breast tumor-initiating cell phenotype. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 139, n. 3, p. 691–703, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-013-2602-2>>.

LI, H.; DUHACHEK-MUGGY, S.; QI, Y.; HONG, Y.; BEHBOD, F.; ZOLKIEWSKA, A.

An essential role of metalloprotease-disintegrin ADAM12 in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, n. 3, p. 759–769, 2012.

LOPEZ-GARCIA, M. a; GEYER, F. C.; LACROIX-TRIKI, M.; MARCHIÓ, C.; REIS-FILHO, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology**, v. 57, n. 2, p. 171–92, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500230>>. Acesso em: 17 jul. 2012.

LYMAN, G. H.; TEMIN, S.; EDGE, S. B.; NEWMAN, L. A.; TURNER, R. R.; WEAVER, D. L.; III, A. B. B.; BOSSERMAN, L. D.; BURSTEIN, H. J.; III, H. C.; HAYMAN, J.; PERKINS, C. L.; PODOLOFF, D. A.; GIULIANO, A. E.; LYMAN, G. H.; CANCER, F. H. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer : American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. **Journal of clinical oncology**, v. 32, n. 13, 2014.

MANICA, G. C.; , EDNEIA A S RAMOS, MARCO AURELIO SCHULER DE OLIVEIRA, F. F. C.; , FÁBIO DE O PEDROSA, EMANUEL M DE SOUZA, L. de N.; KLASSEN, and G. ADAM33 as a New Biomarker for Invasive Lobular Breast Carcinoma. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 5, n. 1, p. 14–17, 2013. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/1948-5956/JCST-05-014.digital/JCST-05-014.html>>. Acesso em: 29 jun. 2014.

MCGOWAN, P. M.; MCKIERNAN, E.; BOLSTER, F.; RYAN, B. M.; HILL, A. D. K.; MCDERMOTT, E. W.; EVOY, D.; HIGGINS, N. O.; CROWN, J.; DUFFY, M. J. ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. **Annals of Oncology**, n. January, p. 1075–1081, 2008.

MCGOWAN, P. M.; RYAN, B. M.; HILL, A. D. K.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M. J. ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 8, p. 2335–43, 15 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438092>>. Acesso em: 2 jul. 2014.

MENKE, C. H.; BIAZÚS, J. V; XAVIER, N.; CAVALHEIRO, J.; RABIN, E. **Rotinas em mastologia**. 2 edição ed. São Paulo: Artmed, 2006.

MICOCCI, K. C.; MARTIN, A. C. B. M.; MONTENEGRO, C. D. F.; DURANTE, A. C.;

POULIOT, N.; COMINETTI, M. R.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. ADAM9 silencing inhibits breast tumor cell invasion in vitro. **Biochimie**, v. 95, n. 7, p. 1371–1378, 2013. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908413000874>>.

MIERKE, C. T.; FREY, B.; FELLNER, M.; HERRMANN, M.; FABRY, B. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 3, p. 369–383, 2011.

MOCHIZUKI, S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer science**, v. 98, n. 5, p. 621–8, maio 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17355265>>. Acesso em: 14 jul. 2012.

MULLOOLY, M.; MCGOWAN, P. M.; KENNEDY, S. A.; MADDEN, S. F.; CROWN, J.; DONOVAN, N. O.; DUFFY, M. J. ADAM10 : a new player in breast cancer progression ? **British Journal of Cancer**, n. August, p. 945–951, 2015.

MURPHY, G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 12, p. 929–41, dez. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19005493>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

NAKAI, K.; HUNG, M.; YAMAGUCHI, H. Review Article A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. **American journal of cancer research**, v. 6, n. 8, p. 1609–1623, 2016.

NARIȚA, D.; ANGHEL, A.; SECLAMAN, E.; ILINA, R.; CIREAP, N. Molecular profiling of ADAM12 gene in breast cancers. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 51, n. 4, p. 669–676, 2010.

NASSAR, A.; SUSSMAN, Z. M.; LAWSON, D.; COHEN, C. Inference of the basal epithelial phenotype in breast carcinoma from differential marker expression, using tissue microarrays in triple negative breast cancer and women younger than 35. **Breast Journal**, v. 18, p. 399–405, 2012.

NAXEROVA, K.; JAIN, R. K. Using tumour phylogenetics to identify the roots of metastasis in humans. **Nature Reviews Clinical Oncology**, p. 1–15, 2015.

Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrclinonc.2014.238>>.

NEVE, R. M.; CHIN, K.; FRIDLYAND, J.; YEH, J.; BAEHNER, F. L.; FEVR, T.; CLARK, L.; BAYANI, N.; COPPE, J.-P.; TONG, F.; SPEED, T.; SPELLMAN, P. T.; DEVRIES, S.; LAPUK, A.; WANG, N. J.; KUO, W.-L.; STILWELL, J. L.; PINKEL, D.; ALBERTSON, D. G.; WALDMAN, F. M.; MCCORMICK, F.; DICKSON, R. B.; JOHNSON, M. D.; LIPPMAN, M.; ETHIER, S.; GAZDAR, A.; GRAY, J. W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer cell**, v. 10, n. 6, p. 515–27, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2730521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 maio. 2014.

NIELSEN, T. O.; HSU, F. D.; JENSEN, K.; CHEANG, M.; KARACA, G.; HU, Z.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; LIVASY, C.; COWAN, D.; DRESSLER, L.; AKSLEN, L. a; RAGAZ, J.; GOWN, A. M.; GILKS, C. B. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 5367–5374, 2004.

NISHIZAKI, T.; CHEW, K.; CHU, L.; ISOLA, J.; KALLIONIEMI, A.; WEIDNER, N.; WALDMAN, F. M. Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. **International journal of cancer**, v. 74, n. 5, p. 513–7, 21 out. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9355973>>.

O'SHEA, C.; MCKIE, N.; BUGGY, Y.; DUGGAN, C.; HILL, A. D. K.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M. J. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 105, n. 6, p. 754–61, 20 jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767059>>. Acesso em: 21 ago. 2012.

OSBORNE, C. K.; SCHIFF, R.; DUNCAN, D. L.; SMITH, S.; MEDICINE, D. MECHANISMS OF ENDOCRINE RESISTANCE IN BREAST CANCER. **Annu Rev Med**, n. 3, p. 233–247, 2013.

OTA, D.; IKESUE, M.; MATSUI, Y.; ITO, K.; TAKADA, Y.; CHAMBERS, A. F.; UEDE, T. THE CELL TO CELL INTERACTION OF BREAST CANCER CELLS REGULATES CANCER INVASION VIA ADAM15. **American Journal of Immunology**, v. 8, n. 4, p. 123–135, 2012.

PARK, H. S.; JANG, M. H.; KIM, E. J.; KIM, H. J.; LEE, H. J.; KIM, Y. J.; KIM, J. H.; KANG, E.; KIM, S.; KIM, I. A.; PARK, S. Y. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. **Modern pathology**, v. 27, n. 9, p. 1212–1222, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2013.251>>.

PARKER, J. S.; MULLINS, M.; CHEUNG, M. C. U.; LEUNG, S.; VODUC, D.; VICKERY, T.; DAVIES, S.; FAURON, C.; HE, X.; HU, Z.; QUACKENHUSH, J. F.; STIJLEMAN, I. J.; PALAZZO, J.; MATRON, J. S.; NOBEL, A. B.; MARDIS, E.; NIELSEN, T. O.; ELLIS, M. J.; PEROU, C. M. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 2009.

PEROU, C. M.; SÛRLIE, T.; EISEN, M. B.; RIJN, M. Van De; JEFFREYK, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LÛNNING, P. E.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; GRANT, S. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 533, n. May, p. 747–752, 2000.

PETRELLI, N. J.; WINER, E. P.; BRAHMER, J.; DUBEY, S.; SMITH, S.; THOMAS, C.; VAHDAT, L. T.; OBEL, J.; VOGELZANG, N.; MARKMAN, M.; SWEETENHAM, J. W.; PFISTER, D.; KRIS, M. G.; SCHUCHTER, L. M.; SAWAYA, R.; RAGHAVAN, D.; GANZ, P. a; KRAMER, B. Clinical Cancer Advances 2009: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 35, p. 6052–69, 10 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901123>>. Acesso em: 25 jul. 2012.

POWELL, R. M.; WICKS, J.; HOLLOWAY, J. W.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 31, n. 1, p. 13–21, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742294>>. Acesso em: 23 jul. 2012.

PUXEDDU, I.; PANG, Y. Y.; HARVEY, A.; HAITCHI, H. M.; NICHOLAS, B.; YOSHISUE, H.; RIBATTI, D.; CLOUGH, G.; POWELL, R. M.; MURPHY, G.;

HANLEY, N. a; WILSON, D. I.; HOWARTH, P. H.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. The soluble form of a disintegrin and metalloprotease 33 promotes angiogenesis: implications for airway remodeling in asthma. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 6, p. 1400–6, 1406–4, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18410963>>. Acesso em: 26 jul. 2012.

RAOUF, A.; SUN, Y.; CHATTERJEE, S.; BASAK, P. The biology of human breast epithelial progenitors. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 23, n. 5, p. 606–12, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609813>>. Acesso em: 23 jul. 2012.

REISS, K.; SAFTIG, P. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 2, p. 126–37, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19049889>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

ROY, R.; RODIG, S.; BIELENBERG, D.; ZURAKOWSKI, D.; MOSES, M. A. ADAM12 Transmembrane and Secreted Isoforms Promote Breast Tumor Growth. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 23, p. 20758–20768, 2011.

RUFF, M.; LEYME, A.; CANN, F. Le; BONNIER, D.; LE, J. The Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 Is Associated with TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. **PloS one**, p. 1–24, 2015.

SATO, K.; MIYASHITA, M.; ISHIDA, T.; SUZUKI, A.; TADA, H.; WATANABE, G.; SATO-TADANO, A.; WATANABE, M.; OHUCHI, N. Prognostic significance of the progesterone receptor status in Ki67-high and -low Luminal B-like HER2-negative breast cancers. **Breast Cancer**, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12282-014-0575-6>>.

SCHULER SL, GURMINI J, CECÍLIO WA, VIOLA DE AZEVEDO ML, OLANDOSKI M, de N. L. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 32, p. 184–189, 2008.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. a. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & development**, v. 17, n. 1, p. 7–30, 1 jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514095>>.

Acesso em: 15 jul. 2012.

SENISKI, G. G.; CAMARGO, A. a; IERARDI, D. F.; RAMOS, E. a S.; GROCHOSKI, M.; RIBEIRO, E. S. F.; CAVALLI, I. J.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M.; ZANATA, S. M.; COSTA, F. F.; KLASSEN, G. ADAM33 gene silencing by promoter hypermethylation as a molecular marker in breast invasive lobular carcinoma. **BMC cancer**, v. 9, p. 80, jan. 2009. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2660367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 jul. 2012.

SETHI, N.; KANG, Y. Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 10, p. 735–48, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21941285>>.

SIMPSON, P. T.; REIS-FILHO, J. S.; GALE, T.; LAKHANI, S. R. Molecular evolution of breast cancer. **The Journal of pathology**, v. 205, n. 2, p. 248–54, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15641021>>. Acesso em: 25 jul. 2012.

SINGLETARY, S. E. Rating the risk factors for breast cancer. **Annals of surgery**, v. 237, n. 4, p. 474–82, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1514477&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SMITH, K. M.; GAULTIER, A.; COUSIN, H.; ALFANDARI, D.; WHITE, J. M.; DESIMONE, D. W. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. **The Journal of cell biology**, v. 159, n. 5, p. 893–902, 9 dez. 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2173380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 jul. 2012.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; EYSTEIN LØNNING, P.; BØRRESEN-DALE, a L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

TAHERIAN, A.; LI, X.; LIU, Y.; HAAS, T. a. Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. **BMC cancer**, v. 11, n. 1, p. 293, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/293>>.

TAKEDA, S. ADAM and ADAMTS Family Proteins and Snake. **toxins**, p. 8–11, 2016.

TOQUET, C.; COLSON, A.; JARRY, A.; BEZIEAU, S.; VOLTEAU, C.; BOISSEAU, P.; MERLIN, D.; LABOISSE, C. L.; MOSNIER, J.-F. ADAM15 to $\alpha 5\beta 1$ integrin switch in colon carcinoma cells: a late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 130, n. 2, p. 278–87, 15 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21190186>>. Acesso em: 27 jul. 2012.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; BAUMFORTH, K.; WEI, W.; DZIECHCIARKOVA, M.; EHRMANN, J.; KLEIN, J.; FRIDMAN, E.; SKARDA, J.; SROVNAL, J.; HAJDUCH, M.; MURRAY, P.; KOLAR, Z. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. **BMC cancer**, v. 7, p. 55, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1852112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 jul. 2012.

VALLEJOS, C. S.; GÓMEZ, H. L.; CRUZ, W. R.; PINTO, J. a; DYER, R. R.; VELARDE, R.; SUAZO, J. F.; NECIOSUP, S. P.; LEÓN, M.; DE LA CRUZ, M. a; VIGIL, C. E. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. **Clinical breast cancer**, v. 10, n. 4, p. 294–300, 1 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705562>>. Acesso em: 17 jul. 2012.

VERBISCK, N. M.; COSTA, E. T.; COSTA, F. F. et al. ADAM23 Negatively Modulates $\alpha v\beta 3$ Integrin Activation during Metastasis.pdf. **cancer research**, v. 69, p. 5546–5552, 2009.

VIALE, G.; SLAETS, L.; BOGAERTS, J.; RUTGERS, E.; VAN'T VEER, L.; PICCART-GEBHART, M. J.; DE SNOO, F. A.; STORK-SLOOTS, L.; RUSSO, L.; DELL'ORTO, P.; VAN DEN AKKER, J.; GLAS, A.; CARDOSO, F. High concordance of protein (by IHC), gene (by FISH; HER2 only), and microarray readout (by TargetPrint) of ER,

PgR, and HER2: Results from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 4, p. 816–823, 2014.

VIRNIG, B. a; SHAMLIYAN, T.; TUTTLE, T. M.; KANE, R. L.; WILT, T. J. Diagnosis and management of ductal carcinoma in situ (DCIS). **Evidence report/technology assessment**, v. 185, n. 185, p. 1–549, set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629475>>.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Molecular oncology**, v. 4, n. 3, p. 192–208, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452298>>. Acesso em: 26 jul. 2012.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591–602, ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056258>>. Acesso em: 19 jul. 2012.

WELLS, J. M.; PIPA, J.; SHIN, S. J. Lobular neoplasia of the breast revisited with emphasis on the role of E-cadherin immunohistochemistry. **The American journal of surgical pathology**, v. 38, n. 3, p. 434–5, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441664>>.

WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 598–606, out. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067403001108>>. Acesso em: 15 jul. 2012.

XING, L.; HUNG, M.; BONFIGLIO, T.; HICKS, D. G.; TANG, P. Breast Cancer : Basic and Clinical Research The Expression Patterns of ER , PR , HER2 , CK5 / 6 , EGFR , Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, p. 35–41, 2010.

YANG, Y.; HAITCHI, H. M.; CAKEBREAD, J.; SAMMUT, D.; HARVEY, A.; POWELL, R. M.; HOLLOWAY, J. W.; HOWARTH, P.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. Epigenetic mechanisms silence a disintegrin and metalloprotease 33 expression in bronchial epithelial cells. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121,

n. 6, p. 1393–9, 1399–14, jun. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423563>>. Acesso em: 27 jul. 2012.

YANG, Y.; WICKS, J.; HAITCHI, H. M.; POWELL, R. M.; MANUYAKORN, W.; HOWARTH, P. H.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. Regulation of a disintegrin and metalloprotease-33 expression by transforming growth factor- β . **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 46, n. 5, p. 633–40, maio 2012.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227561>>. Acesso em: 7 ago. 2012.

YODER, B. J.; WILKINSON, E. J.; MASSOLL, N. a. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. **The breast journal**, v. 13, n. 2, p. 172–9, 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319859>>.

ZHAO, M.; RAMASWAMY, B. Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 248–263, 2014.

ZHENG, X.; JIANG, F.; KATAKOWSKI, M.; LU, Y.; CHOPP, M. ADAM17 promotes glioma cell malignant phenotype. **Molecular carcinogenesis**, v. 51, n. 2, p. 150–164, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21480393>>.

ZHENG, X.; JIANG, F.; KATAKOWSKI, M.; ZHANG, Z. G.; LU, Q.; CHOPP, M. ADAM17. **Cancer biol ther**, v. 8, n. 11, p. 1045–1054, 2009.

ZHONG, J. L.; POGHOSYAN, Z.; PENNINGTON, C. J.; SCOTT, X.; HANDSLEY, M. M.; WARN, A.; GAVRILOVIC, J.; HONERT, K.; KRÜGER, A.; SPAN, P. N.; SWEEP, F. C. G. J.; EDWARDS, D. R. Distinct functions of natural ADAM-15 cytoplasmic domain variants in human mammary carcinoma. **Molecular cancer research : MCR**, v. 6, n. 3, p. 383–94, mar. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296648>>. Acesso em: 2 jul. 2014.

ZIGRINO, P.; STEIGER, J.; FOX, J. W.; LO, S.; SCHILD, A.; NISCHT, R.; MAUCH, C. Role of ADAM-9 Disintegrin-Cysteine-rich Domains in Human Keratinocyte Migration *. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30785–30793, 2007.

